

AC

English Abstract for JP 6-503963

New immunoglobulin(s) having marine CDRs in human framework regions - have lower antigenicity; useful for treating e.g. HSV, CMV, T-cell disorders, myeloid disorders and auto-immune conditions

Patent Assignee: PROTEIN DESIGN LABS INC (PROT-N)

Inventor: CO M S; COELINGH K L; LANDOLFI N F; QUEEN C L; SCHNEIDER W P; SELICK H E; CO M

Number of Countries: 049 Number of Patents: 019

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
WO 9211018	A1	19920709	WO 91US9711	A	19911219	199230 B
AU 9191726	A	19920722	AU 9191726	A	19911219	199244
			WO 91US9711	A	19911219	
EP 566647	A1	19931027	WO 91US9711	A	19911219	199343
			EP 92903551	A	19911219	
JP 6503963	W	19940512	WO 91US9711	A	19911219	199423
			JP 92503758	A	19911219	

Abstract (Basic): WO 9211018 A

Following are: (1) a compsn. comprising a pure humanised immunoglobulin (Ig) specifically reactive with the p75 chain of the human IL-2 receptor; (2) a humanised Ig capable of binding to human IL-2 receptors and comprising one or more CDRs from mik-beta 1 antibody (Ab) in a human framework; (3) treating T cell mediated disorders by administering the Ig of (2); (4) a compsn. comprising a pure humanised Ig specifically reactive with a herpes simplex virus (HSV)-specific epitope; (5) a compsn. comprising a pure humanised Ig capable of inhibiting binding of an HSV protein to a mouse monoclonal Ab (MAb) specifically reactive with the protein, where the Ig comprises at least 1 CDR from the mouse MAb; (6) a humanised Ig capable of binding to HSV comprising one or more CDRs from mouse MAb Fd 79 or Fd 138-80 in a human framework; (7) treating HSV mediated disorders in a human by administering the Ig of (5); (8) a compsn. comprising pure humanised Ig specifically reactive with a CD33 antigen epitope; (9) a compsn. comprising a pure humanised Ig capable of inhibiting binding of CD33 antigen to a mouse MAb specifically reactive with the antigen, where the Ig comprises at least 1 CDR from the mouse MAb; (10) treating myeloid cell-mediated disorders in a human by administering the compsn. of (9); (11) a compsn. comprising pure humanised Ig specifically reactive with a human cytomegalovirus (CMV)-specific epitope; (12) a compsn. comprising a pure humanised Ig capable of inhibiting binding of a CMV protein to a mouse MAb specifically reactive with the protein, where the Ig comprises at least 1 CDR from the mouse MAb; (13) a recombinant Ig compsn. comprising a human framework and 1 foreign CDRs not naturally associated with the framework, where the Ig can bind to CMV; (14) a humanised Ig capable of binding to CMV and comprising one or more CDRs from a mouse MAb in a human framework, where the MAb is CMV5, CMV109 or CMV115; (15) treating CMV mediated disorders in a human by administering the Ig of (14) or a combination of 2 or more of these Igs; (16) a compsn. comprising pure humanised Ig specifically reactive with human gamma-IFN; (17) a recombinant Ig compsn. comprising a human framework and one or more CDRs not naturally associated with the framework, where the Ig specifically inhibits binding of human gamma-IFN to a human gamma-IFN receptor; and (18) treating autoimmune

disorders in a human be administering the compsn. of (17).

USE/ADVANTAGE - The therapeutic agents and non-immunogenic Abs have strong affinities for their predetermined antigen. They are useful in the treatment of human T cell, HSV and CMV mediated disorders in treating myeloid leukaemia related disorders and in treating human autoimmune disorders. The humanised Ig's may be used alone or in combination with chemotherapeutic agents such as non-steroidal anti-inflammatory drugs or immunosuppressants. Antibodies against CMV may be used to detect CMV antigens and to isolated CMV infected cells.

PCT

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION
International Bureau

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification 5 : A61K 35/14, 39/00, C07K 15/00		A1	(11) International Publication Number: WO 92/11018 (43) International Publication Date: 9 July 1992 (09.07.92)
(21) International Application Number: PCT/US91/09711 (22) International Filing Date: 19 December 1991 (19.12.91)			(74) Agent: SMITH, William, M.; Townsend and Townsend, One Market Plaza, 2000 Steuart Tower, San Francisco, CA 94105 (US).
(30) Priority data: 634,278 19 December 1990 (19.12.90) US			(81) Designated States: AT, AT (European patent), AU, BB, BE (European patent), BF (OAPI patent), BG, BJ (OAPI patent), BR, CA, CF (OAPI patent), CG (OAPI patent), CH, CH (European patent), CI (OAPI patent), CM (OAPI patent), CS, DE, DE (European patent), DK, DK (European patent), ES, ES (European patent), FI, FR (European patent), GA (OAPI patent), GB, GB (European patent), GN (OAPI patent), GR (European patent), HU, IT (European patent), JP, KP, KR, LK, LU, LU (European patent), MC (European patent), MG, ML (OAPI patent), MN, MR (OAPI patent), MW, NL, NL (European patent), NO, PL, RO, SD, SE, SE (European patent), SN (OAPI patent), SU ⁺ , TD (OAPI patent), TG (OAPI patent).
(71) Applicant: PROTEIN DESIGN LABS, INC. [US/US]; 2375 Garcia Avenue, Mountain View, CA 94043 (US).			
(72) Inventors: QUEEN, Cary, L. ; 622 Benvenue Street, Los Altos, CA 94022 (US). CO, Man, Sung ; 10230 Yoshino Place, Cupertino, CA 95014 (US). SCHNEIDER, William, P. ; 484 Loreto Street, Mountain View, CA 94041 (US). LANDOLFI, Nicholas, F. ; 246 Seaside Drive, Milpitas, CA 95035 (US). COELINGH, Kathleen, L. ; 1509 Dolores Avenue, San Francisco, CA 94114 (US).			
Published <i>With international search report.</i>			

(54) Title: IMPROVED HUMANIZED IMMUNOGLOBULINS

(57) Abstract

Novel humanized immunoglobulins having one or more complementarity determining regions (CDR's) and possible additional amino acids from a donor immunoglobulin and a framework region from an accepting human immunoglobulin are provided for a number of antigens.

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平6-503963

第1部門第1区分

(43)公表日 平成6年(1994)5月12日

(51)Int.Cl.*	識別記号	府内整理番号	F I
C 12 P 21/08		8214-4B	
A 61 K 35/12		7431-4C	
35/72		7431-4C	
	8931-4B	C 12 N 15/00	A
	8931-4B		A

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 38 頁) 最終頁に統く

(21)出願番号	特願平4-503758
(86) (22)出願日	平成3年(1991)12月19日
(85)翻訳文提出日	平成5年(1993)6月18日
(86)国際出願番号	PCT/US91/09711
(87)国際公開番号	WO92/11018
(87)国際公開日	平成4年(1992)7月9日
(31)優先権主張番号	634,278
(32)優先日	1990年12月19日
(33)優先権主張国	米国(US)

(71)出願人	プロテイン・デザイン・ラブス, インコーポレイティド アメリカ合衆国, カリフォルニア 94043, マウンテンビュー, ガルシア アベニュー 2375
(72)発明者	クイーン, キャリー エル. アメリカ合衆国, カリフォルニア 94022, ロスアルトス, ベンブニューストリート 622
(74)代理人	弁理士 宇井 正一 (外4名)

最終頁に統く

(54)【発明の名称】 改良ヒト化免疫グロブリン

(57)【要約】

1又は複数の相補性決定基(CDR)、並びに可能として供与性免疫グロブリンに由来する追加のアミノ酸及び受容性ヒト免疫グロブリンに由来するフレームワーク領域を有する新規のヒト化免疫グロブリンを多数の抗原のために提供する。

請求の範囲

- ヒトIL-2レセプターのp75鎖に特異的に反応性な実質的に純粋な免疫グロブリンを含んで成る組成物。
- 前記免疫グロブリンが約 $10^7 M^{-1}$ 又はそれより強力なヒトIL-2レセプターに対する結合親和力を示す、請求項1に記載の組成物。
- 前記免疫グロブリンが、ヒトp75タンパク質に反応性な免疫グロブリンに由来する CDRに実質的に相同な1又は複数の外来性CDRを含んで成る、請求項1に記載の組成物。
- 前記免疫グロブリンがヒトIL-2レセプターのp75鎖へのインターロイキン-2(IL-2)の結合を阻害することができる、請求項1に記載の組成物。
- 前記ヒト化免疫グロブリンが少なくとも2種類の免疫グロブリンに由来するアミノ酸配列を有するヒトフレームワーク領域を含んで成る、請求項1に記載の組成物。
- ヒトイントロイキン-2レセプターに結合することのできるヒト化免疫グロブリンであって、前記免疫グロブリンがヒトフレームワークにおいて mik-β1抗体に由来する1又は複数の相補性決定領域(CDR)を含んで成る免疫グロブリン。
- 前記ヒトフレームワークが Lay免疫グロブリンフレームワークに実質的に相同である、請求項6に記載のヒト化免疫グロブリン。
- ヒトT細胞上のインターロイキン-2レセプターへのIL-2の結合を阻害することのできる、請求項6に記載のヒト化免疫グロブリン。
- ヒト患者におけるT-細胞媒介障害を処置する方法であって、前記患者に治療的に有効な用量の請求項6に記載の免疫グロブリン又はPd138-80である、ヒト化免疫グロブリン。
- 前記ヒトフレームワークがE₀又は P₀免疫グロブリンフレームワークに実質的に相同である、請求項19に記載のヒト化免疫グロブリン。
- HSVを中和することのできる請求項19に記載のヒト化免疫グロブリン。
- ヒト患者におけるヘルペス単純ウイルス媒介障害を処置する方法であって、前記患者に治療的に有効な用量の請求項14に記載の免疫グロブリンを投与することを含んで成る方法。
- CD33抗原エピトープに特異的に反応性な実質的に純粋なヒト化免疫グロブリンを含んで成る組成物。
- 前記免疫グロブリンの少なくとも一本の鎖の可変領域がヒトフレームワークにおいて、非ヒト抗体に由来する3つの相補性決定領域(CDR)を含んで成る、請求項23に記載の組成物。
- 前記抗体が重鎖である、請求項24に記載の組成物。
- 前記非ヒト抗体がM195である、請求項24に記載の組成物。
- CD33抗原の、該抗原に特異的に反応性なマウスモノクローナル抗体への結合を阻害することのできる実質的に純粋な免疫グロブリンを含んで成り、ここでこのヒト化免疫グロブリンがマウスモノクローナル抗体に由来する少なくとも1つの相補性決定領域(CDR)を含んで成る、組成物。
- 前記ヒト化免疫グロブリンが約 $10^7 M^{-1}$ 又はそれより強力な結合親和力を示す、請求項27に記載の組成物。
- マウスM195抗体のヒト細胞への結合を阻害することのできる、請求項27に記載の組成物。
- 前記ヒト化免疫グロブリンがE₀免疫グロブリンフレームワークに実質的に相同であるヒトフレームワークを含んで成る、請求項

特表平6-503963 (2)

を投与することを含んで成る方法。

- 細胞障害剤と組合せた、請求項6に記載のヒト化免疫グロブリン。
- ヘルペス単純ウイルス特異的エピトープに特異的に反応性な実質的に純粋なヒト化免疫グロブリンを含んで成る組成物。
- 前記エピトープがウイルスの表面糖タンパク質上にある、請求項11に記載の組成物。
- 前記糖タンパク質がgB又はgDである、請求項12に記載の組成物。
- ヘルペス単純ウイルス(HSV)タンパク質の、該タンパク質に特異的に反応性なマウスモノクローナル抗体への結合を阻害することのできる実質的に純粋なヒト化免疫グロブリンを含んで成る組成物であって、ここでこのヒト化免疫グロブリンがマウスモノクローナル抗体に由来する少なくとも1つの相補性決定領域(CDR)を含んで成る、組成物。
- 前記ヒト化免疫グロブリンが約 $10^7 M^{-1}$ 又はそれより強力な結合親和力を示す、請求項14に記載の組成物。
- 前記免疫グロブリンが1型又は2型のヘルペス単純ウイルス(HSV)に結合することができる、請求項14に記載の組成物。
- 前記免疫グロブリンがgB, gD, gG又はgHの HSV糖タンパク質に反応性な免疫グロブリンに由来する CDRに実質的に相同である1又は複数の CDRを含んで成る、請求項14に記載の組成物。
- 前記免疫グロブリンがIgG、免疫グロブリンAイソタイプである、請求項14に記載の組成物。
- ヘルペス単純ウイルスに結合することができ、ヒトフレームワークにおいてマウスモノクローナル抗体に由来する1又は複数の相補性決定領域(CDR)を含んで成り、ここでこのマウス抗体がPd79
- 27に記載の組成物。
- ヒト骨格及びエフェクター細胞の存在下において抗体依存性細胞障害を媒介することのできる、請求項27に記載のヒト化免疫グロブリン。
- ヒト患者における骨髓細胞媒介障害を処置する方法であって、前記患者に治療的に有効な用量の請求項27に記載の組成物を投与することを含んで成る方法。
- 前記免疫グロブリンが細胞障害剤にコンジュゲートされている、請求項27に記載の組成物。
- ヒトサイトメガロウイルス特異的エピトープに特異的に反応性の実質的に純粋なヒト化免疫グロブリンを含んで成る組成物。
- 少なくとも一鎖の可変領域が、ヒトフレームワークにおいて、非ヒト免疫グロブリン鎖に由来する3つの相補性決定領域(CDR)を含んで成る、請求項34に記載の組成物。
- 前記エピトープがウイルス表面糖タンパク質上にある、請求項34に記載の組成物。
- 前記糖タンパク質がgB又はgDである、請求項35に記載の組成物。
- サイトメガロウイルス(CMV)タンパク質の、該タンパク質に特異的に反応性なマウスモノクローナル抗体への結合を阻害することのできる実質的に純粋なヒト化免疫グロブリンを含んで成り、ここでこのヒト化免疫グロブリンがマウスモノクローナル抗体に由来する少なくとも1つの相補性決定領域(CDR)を含んで成る、組成物。
- 前記ヒト化免疫グロブリンが約 $10^7 M^{-1}$ 又はそれより強力な結合親和力を示す、請求項38に記載の組成物。
- ヒトフレームワーク、及びこのフレームワークに天然には連結していない1又は複数の外来性相補性決定領域(CDR)を含んで成

特表平6-503963 (3)

る組換え免疫グロブリン組成物であって、ここで該免疫グロブリンが CHV に結合することのできる、組換え免疫グロブリン組成物。

41. 前記外来性 CDR の全てが免疫グロブリンの重鎖の上に位置している、請求項 40 に記載の組成物。

42. 前記免疫グロブリンが IgG₁ 免疫グロブリンアイソタイプである、請求項 40 に記載の組成物。

43. 前記免疫グロブリンが CHV のヒト細胞への結合を阻止することができる、請求項 40 に記載の組成物。

44. 前記フレームワーク領域が少なくとも 2 種類のビト免疫グロブリンに由来するアミノ酸配列を含んで成る、請求項 40 に記載の免疫グロブリン。

45. サイトメガロウイルスに結合することができ、ヒトフレームワークにおいてマウスモノクローナル抗体に由来する 1 又は複数の相補性決定領域(CDR) を含んで成り、ここでこのマウス抗体が CHV5, CHV109 又は CHV115 である、ヒト化免疫グロブリン。

46. 前記ヒトフレームワークが IgG₁ 又は IgG₂ 免疫グロブリンフレームワークに実質的に相同である、請求項 45 に記載のヒト化免疫グロブリン。

47. CHV を中和することができる、請求項 45 に記載のヒト化免疫グロブリン。

48. ヒト患者におけるサイトメガロウイルス媒介障害を処置する方法であって、前記患者に治療的に有効な用量の請求項 45 に記載の免疫グロブリンを投与することを含んで成る方法。

49. ヒト患者におけるサイトメガロウイルス媒介障害を処置する方法であって、前記患者に治療的に有効な量の 2 種以上の請求項 45 に記載の免疫グロブリンの組合せを投与することを含んで成る方法。

50. ヒト Ig - IPN に特異的に反応性な実質的に純粋なヒト化免疫

グロブリンを含んで成る組成物。

51. 少なくとも一箇の可変領域が、ヒトフレームワークにおいて、非ヒト抗体に由来する 3 つの相補性決定領域を含んで成る、請求項 50 に記載の組成物。

52. 前記非ヒト抗体が IgG₂ である、請求項 51 に記載の組成物。

53. ヒト Ig - IPN のヒト Ig - IPN レセプターへの結合を阻害することができる、請求項 50 に記載の組成物。

54. ヒトフレームワーク、及びこのフレームワークに天然には連結していない 1 又は複数の外来性相補性決定領域(CDR) を含んで成る組換え免疫グロブリン組成物であって、ここで該免疫グロブリンがヒト Ig - IPN のヒト Ig - IPN レセプターへの結合を特異的に阻害することができる、組換え免疫グロブリン組成物。

55. 1 又は複数の前記外来性 CDR が IgG₂ 抗体に由来する CDR に実質的に相同である、請求項 54 に記載の組成物。

56. 前記免疫グロブリンが IgG₁ 免疫グロブリンアイソタイプである、請求項 54 に記載の組成物。

57. 前記免疫グロブリンが、ヒト Ig - IPN 抗体のヒト細胞への結合を阻止することができる、請求項 54 に記載の組成物。

58. ヒト患者における自己免疫障害を処置する方法であって、前記患者に治療的に有効な用量の請求項 54 に記載の組成物を投与することを含んで成る方法。

59. 前記免疫グロブリンが細胞障害剤にコンジュゲートされている、請求項 11 に記載の組成物。

60. 前記免疫グロブリンが細胞障害剤にコンジュゲートされている、請求項 40 に記載の組成物。

明細書

改良ヒト化免疫グロブリン

発明の分野

本発明は一般に、新規治療薬を開発するための組換え DNA 技術とモノクローナル抗体技術との組合せ、そしてより詳しくは、所望の抗原に対する強い親和力を有する非免疫原性抗体の製造に関する。

発明の背景

1970 年代中頃におけるモノクローナル抗体技術の出現は新世代の医薬品の先駆けとなった。ここで初めて研究者及び臨床医師は、所望する抗原部位に対して結合することができ、且つ、種々の免疫学的エフェクター機能を有する本質的に無限な量の均一な抗体に遭遇した。「モノクローナル抗体」として知られるこれらのタンパク質は例えば生体内における有害な細胞の除去において大いに有望であると考えられていた。事実、モノクローナル抗体の臨床的価値はその単独での利用に関して無限であると思われている。

残念ながら、これらのタンパク質に基づく通常な治療製品の開発はモノクローナル抗体の生産に固有ないいくつかの欠点によってかなり妨げられている。例えば、ほとんどのモノクローナル抗体はマウスに由来しており、それ故ヒトと完全によく適合しない。これらは更にヒトにおいて用いたときに別の重要な免疫グロブリン機能特性を欠いている。

おそらく最も重要なのは、非ヒトモノクローナル抗体はヒトの患者の中に注射されたときに免疫原となるかなりのアミノ酸配列領域を含むであろう。数多くの研究が示すには、外來性抗体の注射の後、患

者により保持される免疫応答はかなり強くなることがあり、初期処置の後のその抗体の治療的有用性は本質的に消えてしまうものである。更に、増え続けている種々のマウス又はその他の抗原性(ヒトに対する)モノクローナル抗体が種々の疾患の処置のために開発されることが予測されるに従い、任意の非ヒト抗体による 1 又は数回の処置の後のその後の処置は、交差反応性のため、たとえそれとは無関係の治療であったとしても、効かない、又はそれ自体が危険ともなる。

いわゆる「キメラ抗体」(例えば、ヒトの定常領域に連結したマウスの可変領域)の生産はある程度有用であることが実証されているが、決定的な免疫原的な問題が残っている。更に、ヒト細胞を不死化させる又は所望の抗原に対するヒトイムノグロブリンを生産することができるヒトハイブリドーマを作り上げる努力は、特に重要なヒト抗原に関連して不成功に終わっている。最近、供与性マウス又はラット免疫グロブリン由来の相補性決定領域(CDR) と組合せたヒトフレームワーク領域を有する免疫グロブリンを生産せしめるのに組換え DNA 技術が利用されている(例えば EPO 公開 0239400 号を参照のこと)。このような新規のタンパク質は「再形成化」又は「ヒト化」免疫グロブリンと呼ばれており、そして供与性免疫グロブリンの CDR をヒトフレームワークと組合せることによってそれをヒト特異免疫グロブリンへと変えるプロセスは「ヒト化」と呼ばれている。ヒト化抗体は重要であり、なぜならそれらはもとの抗体と同様に同一の抗原に結合するが、ヒトに注射されたときのその免疫原性は低いからである。

しかしながら、ヒト化抗体に関する主たる問題は抗原に対する親和性の消失であり(Jonesら *Nature*, 321, 522-525 (1986))、ある状況においては、特に抗原がタンパク質であるとき、10 倍以上相違

特表平6-503963 (4)

する(Verbovenら *Science*, 239, 1534-1536 (1988))。親和力の消失はむろん非常に望ましくない。少なくとも、このことはより高い価格及びより高い有害な作用の危険性において、より多量のヒト化抗体を患者に投与しなくてはならないことを意味するであろう。より重要には、低い親和力を有する抗体はより劣った生物学的機能、例えば補体溶解、抗体依存細胞的細胞障害又はウイルス中和を有する。例えば、部分的ヒト化抗体BiVACONにおける親和力の消失は補体溶解を媒介するその能力の全ての損失の原因となりうる(Bieckmanら、*Nature*, 322, 323-327 (1989)；表1参照)。

使って、所望する抗原と強い親和力を特異的に反応するヒト化抗体が要望されている。このようなヒト化免疫グロブリンはヒトにおいて実質的に非免疫原的であり続けるながら、治療剤及びその他の用途に適する状態において簡単に、且つ、経済的に生産されるべきである。本発明はこのような及びその他の要望を満足せしめる。

発明の要約

本発明は、例えばT細胞により媒介されるヒト障害の処置において有用である新規組成物を提供し、該組成物は、ヒトIL-2レセプターへのヒトIL-2の結合を特異的に阻止することができそして/またはヒトIL-2レセプターのp75タンパク質に結合することができるヒト化免疫グロブリンを含有する。該免疫グロブリンは、2対の軽鎖/重鎖複合体を有し、典型的には少なくとも1本の鎖がヒトフレームワーク複合セグメントに複数のマウス相補性決定領域を含んで成る。例えば、追加の天然由来のマウスアミノ酸残基を有するかまたは有しないマウス相補性決定領域を用いて、約 $10^4 M^{-1}$ よりも強力な親和力レベルにおいてp75タンパク質に結合することができるヒト化抗体を生産することができる。

強力な親和力レベルにおいてCD33抗原に結合することができるヒト化抗体を生産することができる。これらのヒト化免疫グロブリンはCD33に対するCDR-供与性マウスモノクローナル抗体の結合性をもブロックすることができる。これらのヒト化免疫グロブリンは実質的に純粋な状態において単独で利用されるか、又は化学治療剤、例えば白血病細胞に対して活性であるシトシンアラビノースもしくはダクノリビシンと一緒に、又は放射性標識、例えばヨウ素131と組合されて利用されうる。これらの化合物は全て、白血病及び骨髄細胞により媒介される障害の処置において特に有用である。

本発明は更に、例えばCMVにより媒介されるヒト障害の処置において有用である新規組成物を提供し、該組成物はCMVレセプターへのCMVの結合を特異的に阻止することができそして/又はCMV抗原に結合することができるヒト化免疫グロブリンを含有する。例えば、追加の天然由来のマウスアミノ酸残基を有するか又は有しないマウス相補性決定領域をヒトフレームワーク領域の中に導入して、約 $10^4 M^{-1}$ よりも強力な親和力レベルにおいてCMVに結合することができるヒト化抗体を生産することができる。これらのヒト化免疫グロブリンはCMVに対するCDR-供与性マウスモノクローナル抗体の結合性をもブロックすることができる。これらのヒト化免疫グロブリンは実質的に純粋な状態において単独で利用されるか、又は化学治療剤、例えばアシクロビルもしくはCMV感染細胞に活性なガンシクロビルと一緒に、又は細胞障害剤と組合せて利用されうる。これらの化合物は全て、CMVにより媒介される障害の処置において特に有用である。

本発明は更に、例えばヒト自己免疫障害の処置において有用である新規組成物を提供し、該組成物は γ -IPNに特異的に結合することができるヒト化免疫グロブリンを含有する。例えば、追加の天然

これらのヒト化免疫グロブリンはp75に対するCDR-供与性(donating)マウスモノクローナル抗体の結合性をもブロックすることができる。

本発明は更に、例えばHSVにより媒介されるヒト障害の処置において有用である新規組成物を提供し、該組成物はHSVレセプターへのHSVの結合を特異的に阻止することができそして/又はHSV特異的タンパク質に結合することができるヒト化免疫グロブリンを含有する。該免疫グロブリンは、2対の軽鎖/重鎖複合体を有し、その少なくとも1本の鎖はヒトフレームワーク複合セグメントに複数的に連続された1又は複数のマウス相補性決定領域を含んで成る。例えば、追加の天然由来のマウスアミノ酸残基を有するか又は有しないマウス相補性決定領域をヒトフレームワーク領域の中に導入して、約 $10^4 M^{-1}$ よりも強力な親和力レベルにおいてHSV受容タンパク質に結合することができるヒト化抗体を生産することができる。これらのヒト化免疫グロブリンはHSVに対するCDR-供与性マウスモノクローナル抗体の結合性をもブロックすることができる。これらのヒト化免疫グロブリンは実質的に純粋な状態において単独で利用されるか、又は抗ウイルス剤、例えばアシクロビルもしくはウイルス表面にて活性な細胞障害剤と一緒に利用されうる。これらの化合物は全て、HSVにより媒介される障害の処置において特に有用である。

本発明は更に、例えば骨髄白血病関連ヒト障害の処置において有用である新規組成物を提供し、該組成物はCD33抗原に特異的に結合することができるヒト化免疫グロブリンを含有する。該免疫グロブリンは、2対の軽鎖/重鎖複合体を有し、その少なくとも1本の鎖はヒトフレームワーク複合セグメントに複数的に連続された1又は複数のマウス相補性決定領域を含んで成る。例えば、追加の天然由来のマウスアミノ酸残基を有するか又は有しないマウス相補性決定領域をヒトフレームワーク領域の中に導入して、約 $10^4 M^{-1}$ よりも

由来のマウスアミノ酸残基を有するか又は有しないマウス相補性決定領域をヒトフレームワーク領域の中に導入して、約 $10^4 M^{-1}$ よりも強力な親和力レベルにおいて γ -IPNに結合することができるヒト化抗体を生産することができる。これらのヒト化免疫グロブリンは γ -IPNに対するCDR-供与性マウスモノクローナル抗体の結合性をもブロックすることができる。これらのヒト化免疫グロブリンは実質的に純粋な状態において単独で利用されるか、又は化学治療剤、例えば非スチロイド系、抗炎症薬、コルチコステロイド又は免疫抑制剤と一緒に利用されうる。これらの化合物は全て、自己免疫障害の処置において特に有用である。

図面の簡単な説明

図1。ヒト化抗体(下行)と比べた、マウスPd75抗体(上行)の軽鎖(A)及び重鎖(B)可変領域のアミノ酸配列(1文字)【シグナル配列を含まず】。各鎖における3つのCDRに下線を付した。マウスアミノ酸により置き換えられているヒト化抗体フレームワーク又は典型的なヒトアミノ酸の残基に二重下線を付した。各行上の第1の位置の番号を左側に示している。

図2。ヒト化抗体(下行)と比べた、マウスPd138-80抗体(上行)の軽鎖(A)及び重鎖(B)可変領域のアミノ酸配列(1文字)【シグナル配列を含まず】。各鎖における3つのCDRに下線を付した。マウスアミノ酸により置き換えられているヒト化抗体フレームワーク又は典型的なヒトアミノ酸の残基に二重下線を付した。各行上の第1の位置の番号を左側に示している。

図3。ヒト化抗体(下行)と比べた、マウスH195抗体(上行)の軽鎖(A)及び重鎖(B)可変領域のアミノ酸配列(1文字)【シグナル配列を含まず】。各鎖における3つのCDRに下線を付した。

特表平6-503963 (5)

マウスアミノ酸により置き代えられているヒト化抗体フレームワーク又は典型的なヒトアミノ酸の残基に二重下線を付した。各行上の第1の位置の番号を左側に示している。

図4. ヒト化抗体(下行)と比べた、マウス *εik-β1*抗体(上行)の軽鎖(A)及び重鎖(B)可変領域のアミノ酸配列(1文字)(シグナル配列を含まず)。各鎖における3つのCDRに下線を付した。マウスアミノ酸により置き代えられているヒト化抗体フレームワーク又は典型的なヒトアミノ酸の残基に二重下線を付した。各行上の第1の位置の番号を左側に示している。

図5. ヒト化抗体(下行)と比べた、マウスCH95抗体(上行)の軽鎖(A)及び重鎖(B)可変領域のアミノ酸配列(1文字)(シグナル配列を含まず)。各鎖における3つのCDRに下線を付した。マウスアミノ酸により置き代えられているヒト化抗体フレームワーク又は典型的なヒトアミノ酸の残基に二重下線を付した。各行上の第1の位置の番号を左側に示している。

図6. 重及び軽鎖可変ドメインcDNAのアンカーハーフメラーゼ連鎖反応(PCR)の図解。RNAはホットフェノール抽出法を利用して約10⁷個のハイブリドーマ細胞から調製した。簡潔すると、細胞をRNA抽出緩衝液(50μMの酢酸ナトリウムpH 5.2/1%のSDS)1ml中に再懸滴し、次いでボルテックスにかけ、0.5mlのフェノールpH 5.2により65℃で15分間、続いて氷上で更に15分間抽出した。水性相を回収し、そしてエタノールで2回沈殿を行った。逆転写酵素(BRL, Bethesda, MD)及びプライマーとしてオリゴ-dT₁₁₋₁₄(Pharmacia, Piscataway, New Jersey)を用いて10μgの全RNAからcDNAを合成した。ボリ(dG)テールを末端デオキシスクレオチドトランスクレーヴ(Invitrogen)(B.Y. Lobら, *Science* 241, 217 (1989))を用いてcDNAの3'末端に連結させ、可変ドメイン連鎖子(V)Asp11Taq(Perkin

Emerald Cellus)を用い、ボリ(dG)テールにハイブリダイズするプライマー-ac045 (TAATCTAGAATTCCCCCCCCCCCCCCCC)及び定常領域連鎖子(C)にハイブリダイズするプライマーにより増幅させた。軽鎖に関して利用したプライマーはac045 (TATAGACCTCAACCTTGGATGGTGGGAAGATGGATACAGTTGGTGC)とした。重鎖に関して利用したプライマーはac047 (TAATAGACCTCAACCTTCCAGTGGATAGAC(CAT)GATGGGG(GC)TGT(TC)GTTTGGC)とした。

かっこ内の配列は塩基組成を示している。この組成は、このプライマーがほとんどのガンマーノー鎖とハイブリダイズできるように導入した。増幅させたフラグメントを次にEcoRI及びHindIIIにより消化し、そしてシーケンシングのためにpUC18ベクターの中にクローンした。

図7. 抗体 *εik-β1*の軽鎖(A)及び重鎖(B)可変領域のcDNAの配列及び軽鎖アミノ酸配列。CDR配列に下線を付した。成熟重鎖タンパク質はアミノ酸23Qより、そして成熟重鎖タンパク質はアミノ酸20Qより開始し、対応のシグナル配列が先行している。

図8. プラスミドpVg1-dhfr(A)及びpVK(B)の図解。プラスミドpVg1-dhfrは以下の部分を含む：amp及びdhfr連鎖子を含む約4200塩基対のBamH I-EcoRIフラグメント；ヒトサイトメガロウイルスIE1-連鎖子アロモーター及びエンハンサーを含む630bpのフラグメント(Bockhart & Cell 41, 521 (1985))（その5'及び9'末端においてEcoRI及びXba Iリシンカーがそれぞれフランクしている）；並びに215bpの先行イントロン及びボリ(A)シグナルを有するヒトガンマ-1定常領域連鎖子を含む2800bpのXba I-BamH Iフラグメント。プラスミドpVKは、ガンマ-1連鎖子を1530bpのヒトカッパー一定常領域連鎖子に置き換え、そしてdhfr連鎖子をEcoRI連鎖子に置き換えることで同様にして作製した。これらのプラスミドは当業

界によく知られている方法を利用して、表示の部分より作製した(Maniatisら, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)を参照のこと)。例えばpVg1-dhfrはプラスミドpVg1(1990年9月28日提出の共有識別米国特許出願番号07/590,274号)より、byg連鎖子含有HindIII-BglIIフラグメントを、dhfr連鎖子を含みそしてBamI部位に至る660bpのフラグメントに置き換えることによって作製した(Simonsenら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 2495 (1983))。

図9. アイソトープ結合化コントロール抗体(ー)、ヒト化 *εik-β1*抗体(—)、キメラ *εik-β1*抗体(···)により染色したTJ8細胞のフローサイトメトリー。細胞を約5×10⁶/mlにてFACS緩衝液(PBS+2%のBSA+0.1%のアザイド)の中に懸滴した。100μlの細胞懸滴物をポリスチレンチューブに移し、そして精製抗体100ngと氷上で30分間インキュベートした。この細胞をFACS緩衝液で洗い、次いでヤギ抗ヒトIg抗体と氷上で更に30分間インキュベートした。次にこの細胞を洗い、そしてFITCラベル化ウサギ抗-ヤギIg抗体と30分間インキュベートした。この細胞を再び洗い、そして最後にPBS+1%のパラホルムアルデヒドの中に再懸滴させた。細胞をFACScan (Becton Dickinson)で分析した。

図10. ヒト化 *εik-β1*抗体(下行)及びヒト *lay*抗体(上行)の軽鎖(A)及び重鎖(B)のアミノ酸配列(シグナル配列を含まず)。各鎖の3つのCDRに下線を付した。ヒト抗体におけるマウスのアミノ酸により置き換えられているフレームワークにおけるアミノ酸又は共通のヒトアミノ酸に二重下線を付した。

図11. ヒト化 *εik-β1*重鎖(B)及び軽鎖(A)の作製に用いたオリゴスクレオチド。以下の対のオリゴスクレオチドを複数、シ

ケナーゼで伸長し、そしてpブルースクリプトEks (+)ベクターへのリゲーション前に表示の酵素で切断した：wps54とvc11をXba IとSal Iにより、vc12とwps57をXba IとSal Iにより、vc16とvc13をXba IとKpn Iにより、vc14とvc15をXba IとKpn Iにより。次にwps54-vc11とvc12-wps57のフラグメントをXba IとSal Iで切り出し、pVg1-dhfrのXba I部位の中に一緒にリゲートした；また、vc16-vc13フラグメントとvc14-vc15フラグメントをXba IとKpn Iで切り出し、そしてpVKのXba I部位の中に一緒にリゲートした。

図12. ITJ8細胞へのラベル化 *εik-β1*トレーサーの結合結合。約10⁶のITJ8細胞を3.0mgのラジオヨウ素化マウス *εik-β1*抗体(8μCi/μg)とインキュベートし、次いで200μlの結合用緩衝液(PBS+10%の胎児牛血清+0.1%のNaN₃+10μg/mlのマウスモノクローナルIg)中の様々な量の未標識マウス *εik-β1*抗体(●)又はヒト化 *εik-β1*抗体(○)のいづれかとインキュベートした。0℃で2時間インキュベーションした後、この細胞をマウスIgを含まない結合用緩衝液で2回洗い、そして遠心により離めた。細胞への放射活性結合を測定し、そして結合/遊離cpmの比で表わした。

図13. ヒト化 *εik-β1*+ヒト化抗-Tac抗体によるヒトPEA芽細胞のIL-2刺激増殖の阻害。抗体なし(□)、それぞれ2μgのヒト化 *εik-β1*及びヒト化抗-Tac添加(■)。

図14. ネズミ及びヒト化Fd79抗体の重鎖(A)及び軽鎖(B)、並びにネズミ及びヒト化Fd138-80抗体の重鎖(C)及び軽鎖(D)のアミノ酸配列。cDNAより推定したネズミ抗体の配列(上行)をヒト化抗体配列(下行)と並べて示す。ヒト化Fd79及びFd138-80フレームワーク配列はPoc抗体及びEo抗体それぞれに由来する。残基は

特表平6-503963 (6)

Kabat系に従って番号付けした (B.A.Kabatら, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD) (1987))。各類の3つのCDRを棒で囲った。ネズミ配列により置き換えられた、又は共通ヒト配列の *Asp*又は *Asn*フレームワーク中の残基に下線を付した。

図15. プラスミド *pVgl* (A) 及び *pVK* (B) の図解。プラスミド *pVgl*を以下のフラグメントより作製した: *asp*及び *hyg*遺伝子に含むプラスミド *pSV2kpb*に由来する約4850塩基対の *Bam*H I-EcoR I フラグメント; ヒトサイトメガロウイルス *IE1*遺伝子プロモーター及びエンハンサーを含む 630bp のフラグメント (Boshartら, Cell 41, 521 (1985)) (その5'及び3'末端にてそれぞれ *Eco*R I 及び *Xba* I リンカーがフランクしている); 並びに 215bp の先行イントロン及びボリ (A) シグナルを有するヒトガンマー-1 定常領域遺伝子を含む 2800bp の *Xba* I-BamH I フラグメント。プラスミド *pVK*は、1530-bp のヒトカッパー定常領域遺伝子をガンマー-1 遺伝子で置き換え、そして *asp*を *hyg*遺伝子で置き換えて両様に作製した。

図16. *Pd79* (A) 及び *Pd138-80* (B) 抗体により染色した *HSV-1* 感染化 *Vero* 細胞のサイトメトリー。アイソトープ結合化コントロール抗体 (---)、ヒト化抗体 (· · ·)、キメラ抗体 (-)。 *Vero* 細胞に *HSV-1* (Δ305 突然変異体, (F株)) を 3 pfu/細胞にて一夜感染させた。細胞をトリプシンにより 0.5mg/ml にて 1 分処理し、PBSでよく洗い、そして PACS 濃衝液 (PBS + 2% の BSA + 0.1% のアザイド) 中で約 5×10^6 /ml にて再懸滴した。100 μ l の細胞懸濁物をポリスチレンチューブに移し、そして 100ng の精製抗体と氷上で 30 分間インキュベートした。この細胞を PACS 濃衝液で洗い、そして FITCラベル化ヤギ抗ヒト抗体 (Cappel) と氷上で更に 30 分間インキュベートした。この細胞を再び洗い、そして最後に PBS +

1% のバラカルムアルデヒドの中で再懸滴した。細胞を FACSmate (Becton Dickinson) で分析した。

図17. *Pd79* (A) 及び *Pd138-80* (B) による *HSV-1* の中和。いくつかの希釈率の抗体を 100 pfu のウイルスと混ぜ、次いで 37°C で 1 時間インキュベートした。これらのウイルスを次に癌細胞 *Vero* 細胞を有する 8 ウェルプレートに接種し、そして 37°C で 1 時間吸着させた。この細胞に、培地中の 1% のアガロースをかぶせ、そして 4 日間インキュベートした。ブラックを中性レッドで染めた。

図18. (A) ネズミ又はヒト化 *Pd79*、(B) ネズミ又はヒト化 *Pd138-80*による、組織培養物に散布したウイルスからの細胞の防衛を調べるための感染化 *Vero* 細胞単層の免疫染色。癌細胞 *Vero* 細胞の 24 小時プレートにウイルスを 0.1 pfu/細胞で接種し、次いで培地に 10 μ g/ml の抗体 200 μ l を加える前に 37°C で 2 時間吸着させた。4 日目の終わりに、培養培地を除去し、そしてプレートを 37°C のインキュベーターの中に一夜置いて乾かした。ウイルス抗原を検出するため、各ウェルを 200 μ l の抗-IE1 抗体と 0.5 μ g/ml において 37°C で 1 時間インキュベートし、2 回洗い、そして 200 μ l のペオキシダーゼコンjugate化ヤギ抗マウス IgG (Cappel, 1:300 希釈) と 1 時間、37°C でインキュベートした。このプレートを洗い、次いで基質 3-アミノノ-9-エチルカルバゾール (ABC) (Sigma, St. Louis, MO) で室温において 15 分間発色させた。反応を水ですいで停止させ、次いで風乾した。

図19. 抗体 *M195* の軽鎖 (A) 及び重鎖 (B) 可変領域の cDNA の配列及び翻訳アミノ酸配列。CDR配列に下線を付した。成熟軽鎖タンパク質はアミノ酸 21D より、そして成熟重鎖タンパク質はアミノ酸 20D より開始し、対応のシグナル配列が先行している。

図20. プラスミド *pVgl-dhfr* (A) 及び *pVK* (B) の図解。プラス

ミ *pVgl-dhfr* は以下の部分を含む: *asp*及び *dhfr* 遺伝子を含む約 4200 塩基対の *Bam*H I-EcoR I フラグメント; ヒトサイトメガロウイルス *IE1* 遺伝子プロモーター及びエンハンサーを含む 630bp のフラグメント (Boshart ら Cell 41, 521 (1985)) (その5'及び3'末端において *Eco*R I 及び *Xba* I リンカーがそれぞれフランクしている); 並びに 215bp の先行イントロン及びボリ (A) シグナルを有するヒトガンマー-1 定常領域遺伝子を含む 2800bp の *Xba* I-BamH I フラグメント。プラスミド *pVK* は、ガンマー-1 遺伝子を 1530bp のヒトカッパー定常領域遺伝子に置き換え、そして *dhfr* 遺伝子を *asp* 遺伝子に置き換えることで両様にして作製した。これらのプラスミドは当業界によく知られている方法を利用して、表示の部分より作製した (Maniatis ら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) を参照のこと)。例えば *pVgl-dhfr* はプラスミド *pVgl* より、*hyg* 遺伝子含有 *Bln* II-Bgl II フラグメントを、*dhfr* 遺伝子を含みそして *Bal* II 部位に至る 660bp のフラグメントに置き換えることによって作製した (Simonsen ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 2495 (1983))。

図21. 抗体なし (---)、ヒト化 *M195* 抗体 (· · ·)、キメラ *M195* 抗体 (—) により染色した U937 細胞のフローサイトメトリー。細胞を約 5×10^6 /ml にて PACS 濃衝液 (PBS + 2% の BSA + 0.1% のアザイド) の中に懸滴した。100 μ l の細胞懸濁物をポリスチレンチューブに移し、そして精製抗体 50ng と氷上で 30 分間インキュベートした。この細胞を PACS 濃衝液で洗い、次いで FITCラベル化ヤギ抗ヒト Ig 抗体と氷上で更に 30 分間インキュベートした。この細胞を再び洗い、そして最後に PBS + 1% のバラカルムアルデヒドの中に再懸滴させた。細胞を FACSmate (Becton Dickinson) で分析した。

図22. ヒト化 *M195* 抗体 (下行) 及びヒト *Ig* 抗体 (上行) の軽鎖 (A) 及び重鎖 (B) のアミノ酸配列 (シグナル配列を含まず)。各類の3つのCDRに下線を付した。ヒト抗体におけるマウスのアミノ酸により置き換えられているフレームワークにおける残基に二重線を付した。

図23. ヒト化 *M195* 重鎖 (A: aa 1-4) 及び軽鎖 (B: aa 5-8) の作製に用いたオリゴスクレオチド。以下の対のオリゴスクレオチドを混ぜ、クレノウボリメラーゼで伸長し、そして *pUC18*へのリゲーション前に表示の端部で切断した: aa 1 と aa 2 を *Xba* I と *Kpn* I により、aa 3 と aa 4 を *Xba* I と *Kpn* I により、aa 5 と aa 6 を *Xba* I と *Bln* II により、aa 7 と aa 8 を *Xba* I と *Bln* II により。次に aa 1-aa 2 と aa 3-aa 4 のフラグメントを *Xba* I と *Kpn* I で *pUC18*から切り出し、*pVgl-dhfr* の *Xba* I 部位の中に一緒にリゲートした; また、aa 5-aa 6 フラグメントと aa 7-aa 8 フラグメントを *Xba* I と *Bln* II で切り出し、そして *pVK* の *Xba* I 部位の中に一緒にリゲートした。

図24. U937 細胞へのラベル化 *M195* トランサーの結合結合。約 4×10^6 の U937 細胞を 4.5ng のラジオヨウ素化マウス *M195* 抗体 (5 μ Ci/ μ g) とインキュベートし、次いで 200 μ l の結合用濃衝液 (PBS + 2% の胎児牛血清 + 0.1% のアジ化ナトリウム) 中の様々な量の未標記マウス *M195* 抗体 (●) 又はヒト化 *M195* 抗体 (○) のいづれかとインキュベートした。0°C で 2 時間インキュベーションした後、この細胞を結合用濃衝液で 2 回洗い、そして遠心により集めた。細胞への放射活性結合を測定し、そして結合/収量 cpm の比で表わした。

図25. 抗体 *CH95* の軽鎖 (A) 及び重鎖 (B) 可変領域の cDNA の配列及び翻訳アミノ酸配列。CDR配列に下線を付した。成熟軽鎖タンパク質の開始点を矢印で示し、対応のシグナル配列が先行している。

特表平6-503963(7)

図26. プラスミドpVgl-dhfr (A) 及びpVK(B) の図解。プラスミドpVgl-dhfrは以下の部分を含む： *neo*及びdhfr遺伝子を含む約4200塩基対の *Bam*H I - *Eco*R I フラグメント；ヒトサイトメガロウイルスIE1遺伝子プロモーター及びエンハンサーを含む 630bpのフラグメント(BashartらCell 41, 521 (1985)) (その5'及び3'末端において *Eco*R I 及び *Xba* I リンカーがそれぞれフランクしている)；並びに 215bpの先行イントロン及びポリ(A) シグナルを有するヒトガンマ-1定常領域遺伝子を含む2800bpの *Xba* I - *Bam*H I フラグメント。プラスミドpVKは、ガンマ-1遺伝子を1530bpのヒトカッパー定常領域遺伝子に置き換え、そしてdhfr遺伝子を *spt*遺伝子に置き換えることで同様にして作製した。これらのプラスミドは当業界によく知られている方法を利用して、表示の部分より作製した (Maniatisら、*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) を参照のこと)。例えばpVBP Laser JetシリーズⅡ (PLASE IIは、*hba*遺伝子含有 *Bind* II - *Bgl* II フラグメントを、dhfr遺伝子を含みそして *Bal* II 部位に至る 660bpのフラグメントに置き換えることによって作製した (Simonsenら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 2495 (1983))。

図27. ヒト化CNV5抗体 (下行) 及びヒト *Vol*抗体 (上行) の軽鎖 (A) 及び重鎖 (B) のアミノ酸配列 (シグナル配列を含まず)。各鎖の3つのCDRに下線を付した。ヒト抗体におけるマウスのアミノ酸により置き換えられているフレームワークにおける残基又は共通のヒトアミノ酸に二重下線を付した。

図28. ヒト化CNV5軽鎖 (A: *jB16-jB19*) 及び重鎖 (B: *jB20-jB22*) の作製に用いたオリゴスクレオチド。以下の対のオリゴスクレオチドを混ぜ、クレノウボリノーラーゼで伸長し、そしてpUC18へ

のリゲーション前に表示の酵素で切断した：*jB16*と*jB17*を *Xba* I と *Eco*R I により、*jB18*と*jB19*を *Xba* I と *Eco*R I により、*jB20*と*jB21*を *Xba* I と *Kpn* I により、*jB22*と*jB23*を *Xba* I と *Kpn* I により。次に *jB16-jB17*と*jB18-jB19*のフラグメントを *Xba* I と *Hinf* I で切り出し、そしてpVIIの *Xba* I 部位の中に一緒にリゲートした；また、*jB20-jB21*フラグメントと*jB22-jB23*フラグメントを *Xba* I と *Kpn* I で切り出し、そしてpVgl-dhfrの *Xba* I 部位の中に一緒にリゲートした。

図29. CNV感染化細胞へのラベル化CNV5トレーサーの結合結合。マウス (●) 又はヒト化 (○) CNV5抗体の量を増やしながらトレーサーラジオヨウ素化マウスCNV5と共に CNV-感染化 BBL細胞に加え、次いで細胞に結合したトレーサーの量を決定した。

図30. 抗体AP2の軽鎖 (A) 及び重鎖 (B) 可変領域のcDNAの配列及び粗翻訳アミノ酸配列。CDR配列に下線を付した。成熟軽鎖タンパク質はアミノ酸30Nより、そして成熟重鎖タンパク質はアミノ酸38Qより開始し、対応のシグナル配列が先行している。

図31. プラスミドpVgl-dhfr (A) 及びpVK(B) の図解。プラスミドpVgl-dhfrは以下の部分を含む：*neo*及びdhfr遺伝子を含む約4200塩基対の *Bam*H I - *Eco*R I フラグメント；ヒトサイトメガロウイルスIE1遺伝子プロモーター及びエンハンサーを含む 630bpのフラグメント(BashartらCell 41, 521 (1985)) (その5'及び3'末端において *Eco*R I 及び *Xba* I リンカーがそれぞれフランクしている)；並びに 215bpの先行イントロン及びポリ(A) シグナルを有するヒトガンマ-1定常領域遺伝子を含む2800bpの *Xba* I - *Bam*H I フラグメント。プラスミドpVKは、ガンマ-1遺伝子を1530bpのヒトカッパー定常領域遺伝子に置き換え、そしてdhfr遺伝子を *spt*遺伝子に置き換えることで同様にして作製した。これらのプラスミドは当業

界によく知られている方法を利用して、表示の部分より作製した (Maniatisら、*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) を参照のこと)。例えばpVgl-dhfrはプラスミドpVgl(1990年9月28日提出の共有協定米国特許出願第07/1590,274号)より、*hba*遺伝子含有 *Bind* II - *Bgl* II フラグメントを、dhfr遺伝子を含みそして *Bal* II 部位に至る 660bpのフラグメントに置き換えることによって作製した (Simonsenら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 2495)。

図32. ヒト化AP2抗体 (下行) 及びヒト *Te6*抗体 (上行) の軽鎖 (A) 及び重鎖 (B) のアミノ酸配列 (シグナル配列を含まず)。各鎖の3つのCDRに下線を付した。ヒト抗体におけるマウスのアミノ酸により置き換えられているフレームワークにおける残基又は共通のヒトアミノ酸に二重下線を付した。

図33. ヒト化AP2軽鎖 (A: *rb10-rb13*) 及び重鎖 (B: *rb20-rb23*) の作製に用いたオリゴスクレオチド。以下の対のオリゴスクレオチドを混ぜ、クレノウボリノーラーゼで伸長し、そしてpUC18へのリゲーション前に表示の酵素で切断した：*rb10*と*rb11*を *Xba* I と *Bind* II により、*rb12*と*rb13*を *Xba* I と *Bind* II により、*rb20*と*rb21*を *Xba* I と *Eco*R I により、*rb22*と*rb23*を *Xba* I と *Eco*R I により。次に *rb10-rb11*と*rb12-rb13*のフラグメントを *Xba* I と *Bind* II で切り出し、pVKの *Xba* I 部位の中に一緒にリゲートした；また、*rb20-rb21*フラグメントと*rb22-rb23*フラグメントを *Xba* I と *Hinf* I で切り出し、そしてpVgl-dhfrの *Xba* I 部位の中に一緒にリゲートした。

図34. τ -IFN と様々な濃度のマウスAP2抗体と共にインキュベートし、そして抗-HLA-D抗体により染めたBS294T細胞の蛍光。

発明の詳細な説明

本発明に従い、強力な親和力で所望の抗原に特異的に結合できる複数なヒト化免疫グロブリンが提供される。これらの免疫グロブリンは人体において実質的に非免疫原性であるが、しかし少なくとも約 $10^9 M^{-1}$ 、好みしくは $10^8 M^{-1}$ ~ $10^{10} M^{-1}$ 又はそれより強い結合親和力を有する。本ヒト化免疫グロブリンは、ヒトフレームワーク及び1又は複数の相補性決定領域(CDR)、それに加えて抗原に特異的に反応する供与免疫グロブリンに由来する一定の数のその他のアミノ酸を有するであろう。該免疫グロブリンは経済的に大量に生産でき、そして例えば種々の技術によって種々のヒト疾患の処置における利用性が見い出される。

本発明をより完全に理解してもらうため、いくつかの定義を記載する。本明細書で用いる語「免疫グロブリン」は免疫グロブリン遺伝子により実質的にコード化される1又は複数のポリペプチドより成るタンパク質に関する。認識されている免疫グロブリン遺伝子はカッパー、ラムダ、アルファ、ガンマ (*IgG₁*, *IgG_{2a}*, *IgG_{2b}*, *IgG₃*)、デルタ、エプシロン及びミュー定常領域、並びに骨髄免疫グロブリン可変領域遺伝子が含まれる。全長免疫グロブリンの「軽鎖」(約25kd又は314のアミノ酸)は可変領域遺伝子によりN末端にて(約110のアミノ酸)、そしてカッパー又はラムダ定常領域遺伝子はC末端にてコードされる。全長免疫グロブリンの「重鎖」(約50kd又は446のアミノ酸)は可変領域遺伝子(約116のアミノ酸)及び上記その他の定常領域遺伝子のうちの1つ、例えばガンマ(約330のアミノ酸をコードする)により同様にコードされる。

免疫グロブリンの一形態は抗体の基本的な構造単位を構成する。この形態は四量体であり、そして同一の2対の免疫グロブリン鎖より成り、それぞれの対は一本の軽鎖と一本の重鎖を有する。各対に

特表平6-503963 (B)

おいて、その軽及び重鎖の可変領域は共に抗原に対する結合性のもととなっており、そしてその定常領域は抗体のエフェクター機能のもととなっている。抗体に加えて、免疫グロブリンは種々のその他の形態において存在することができ、それには例えばFab, Fab'及び(Fab')₂、並びに二価ハイブリド抗体（例えばLanzavecchiaら、*Eur.J.Immunol.*, 17, 105 (1987)）及び一本鎖（例えば、Houstonら、*Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, 85, 5879-5883 (1988) 及びBirdら、*Science*, 242, 423-426 (1988)）が含まれる。（一般に、Hoodらの“Immunology” Benjamin, N.Y. 第2版 (1984)、及び HenkleinlerとHoodの*Nature*, 323, 15-16 (1986)を参照のこと）。

3つの超可変領域により干渉されている「フレームワーク」領域より成る免疫グロブリンの軽鎖又は重鎖可変領域は CDRとも呼ばれる。フレームワーク領域及び CDRの長さは正確に決定されている（“Sequences of Proteins of Immunological Interest” E.Kabatら、U.S. Department of Health and Human Services (1983)を参照のこと）。種々の軽鎖又は重鎖のフレームワーク領域の配列が一つの種の中に関連して保存されている。本明細書で用いる「ヒトフレームワーク領域」とは、天然由来のヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域に実質的に同一（約85%以上、通常は90-95%又はそれ以上）であるフレームワーク領域である。構成的軽鎖及び重鎖の組合せフレームワーク領域は CDRを位置決めし、且つ、並べるために働く。CDRは抗原のエピトープへの結合のための主因である。

キメラ抗体は、その軽鎖及び重鎖遺伝子が典型的には連鎖子工学により、異なる種に属する免疫グロブリンの可変及び定常領域遺伝子から作製された抗体である。例えば、マウスモノクローナル抗体に由来する遺伝子の可変セグメントをヒト定常セグメント、例えばガンマー-1及びガンマー-3に連結させることができる。典型的な治

用キメラ抗体はそれ故マウス抗体に由来する可変性又は抗原結合性ドメインとヒト抗体より成るハイブリドタンパク質（例えばA.T.C.C.受託番号CRL 9688は抗-Tac キメラ抗体を生産する）であるが、しかしながらその他の哺乳動物の種も利用されうる。

本明細書で用いる語「ヒト化」免疫グロブリンは、ヒトフレームワーク領域及び非ヒト（通常はマウス又はラット）免疫グロブリンに由来する1又は複数の CDRを含んで成る免疫グロブリンに関する。CDRを提供する非ヒト免疫グロブリンを「供与体」と呼び、そしてフレームワークを提供するヒト免疫グロブリンを「受容体」と呼ぶ。定常領域は存在している必要性はないが、しかしもしそれらがあるならば、それらはヒト免疫グロブリン定常領域と実質的に同一、即ち、少なくとも約85-90%、好ましくは約95%以上同一であるべきである。従って、ヒト化免疫グロブリン全体は、可能としては CDRを除き、天然のヒト免疫グロブリン配列の対応部分と実質的に同一である。「ヒト化抗体」はヒト化軽鎖及びヒト化重鎖イムノグロブリンを含んで成る抗体である。例えば、ヒト化抗体は例えば上記に定義したような典型的なキメラ抗体を含まず、なぜならキメラ抗体の全可変領域は非ヒトであるからである。供与抗体は「ヒト化」のプロセスによって「ヒト化」されると言われており、なぜなら得られるヒト化抗体は CDRを提供する供与抗体のそれと同じ抗原に結合することが予測されるからである。

本法により設計されたヒト化抗体は、抗原結合性又は他の免疫グロブリン機能に実質的に影響を及ぼさない追加の保存性アミノ酸置換を有しうる。保存性置換とは組合せ、例えばgly:ala; val:ile, leu:ala; asp:ala; asn:glu; ser:thr:lys:arg:及びphe:tryを導いている。

ヒト化抗体を含むヒト化免疫グロブリンは連鎖子工学によって作

製されている。既に解説されているほとんどヒト化免疫グロブリン（Jonesら、前掲； Verhaegenら、前掲； Blechmannら、前掲）は、特定の免疫グロブリン鎖のフレームワークと同一のフレームワーク、受容体、及び非ヒト供与体免疫グロブリン鎖に由来する3つの CDRを含んで成る。あるケースにおいては（Blechmannら、前掲）、フレームワーク中の2個の付加アミノ酸を別のヒトフレームワーク鎖中のアミノ酸と同じになるように変えている。本発明は基準を含んでおり、これに従い、ヒト化免疫グロブリン鎖を含んで成る抗体の親和力を強めるため、ヒト化免疫グロブリン鎖のフレームワーク中の一定数のアミノ酸が、受容体ではなく供与体におけるその位置のアミノ酸と同じであるように選ぶ。

本発明は、（例として CDRの入手源としてマウス抗体を使って）ヒト化抗体を生産する従来方法における親和力の低下の2つの原因が、下記のためであるというモデルに基づく：

(1) マウス CDRをヒトフレームワークと結合する時、CDRに密接したフレームワーク中のアミノ酸がマウスの代わりにヒトになる。理論に結び付けようとせずに、本発明者らは、それらの変更されたアミノ酸が供与体マウス抗体中とは異なる静電的または疎水的力を生じるため、それらがわずかに CDRを歪め、そして歪められた CDRは供与抗体中の CDRが行うのと同じく効果的な抗原との接触を行なうことができないと考える：

(2) また、CDRに密接しているがその一部ではない（即ちまだフレームワークの一部である）元のマウス抗体中のアミノ酸は、親和力の原因である抗原との接触を行うことができる。全てのフレームワークアミノ酸がヒトにされるので、抗体がヒト化される時にそれらのアミノ酸は失われる。

(3) 注射したマウス抗体はヒトの諸種系の中で、正常な抗体の

半減期よりもはるかに短い半減期を有することが報告されている（D.Shawら、*J.Immunol.*, 139, 4534-4538 (1987)）。注射したヒト化抗体は天然由来のヒト抗体とより同等な半減期を有することが予測され、より少ない量、且つ、より少ない量で投与されることが可能となる。

これらの問題を回避し、且つ、所望の抗原に対して非常に強力な親和力を有するヒト化抗体を生産するため、本発明はヒト化免疫グロブリンを設計するための1又は複数の以下の原理を利用する。更に、それらの基準は単独で、又は必要ならば組合せて利用することとで、所望の親和力又は他の特徴を獲得することができる。

原理は、受容体として、ヒト化すべき供与体免疫グロブリンとは通常相異性でない特定のヒト免疫グロブリンに由来するフレームワークを利用するか、又は数多くのヒト抗体に由来する共通フレームワークを利用するにある。例えば、データーベンク（例えばナショナルバイオメディカルリサーチファンデーション、プロテインアイデンティフィケーションリソース）における、ヒトの重（又は軽）可変領域に対するマウスの重（又は軽）鎖可変領域の配列の比較が示すには、異なるヒト領域に対する相異性の程度は典型的には約40%から約60-70%まで大きく変動する。受容体免疫グロブリンとして、供与体免疫グロブリンの重鎖（対応の軽鎖）に最も相合るヒト重鎖（対応の軽鎖）の1つを選ぶことにより、供与体免疫グロブリンからヒト化免疫グロブリンとなる際にはほとんどアミノ酸が変更されないであろう。それ故、且つ、ここでも理論に結びつけられることなく、CDRの構造を歪めるような CDR付近のアミノ酸の変化の機会は小さくなる。更に、ヒト化免疫グロブリン鎖を含んで成るヒト化抗体の正確な全般的な形態は供与抗体の形態により近く類似することができ、これも CDRの歪みの総合を下げ

る。

典型的には、少なくとも約10~20種のヒト重鎖の代表的なコレクションにおける3~5つの最も相図な重鎖可変領域配列のうち1つが、重鎖フレームワーク及び同様に重鎖の受けられる受容体として選ばれるであろう。詳しくは、1~3の最も相図な重鎖可変領域のうちの1つが利用されるであろう。選ばれる受容体免疫イムノグロブリンは最も詳しくは供与体免疫グロブリンに対してそのフレームワーク領域において少なくとも約65%の相図性を有するであろう。

多数のケースにおいて、ヒト化鎖及び重鎖が互いに好適に接し合うことを確実にするため、受容体配列として、同一の抗体に由来する鎖及び重鎖を利用するが好ましいと考えられる。この場合、その供与体の鎖及び重鎖は、その完全な配列が知られているヒト抗体、例えば *Ea, Lay, Pow, WoI, Sie, Gal, De* 及び *WEA* 抗体 (Kabat ら、前掲；通常、ヒト鎖の最後の残基のアミノ酸は未知であり、従って別のヒト抗体との相図性によって推定されねばならない) に由来する鎖に対してのみ比較されうる。鎖及び重鎖可変領域配列が共に、供与体の鎖及び重鎖可変領域配列と全般的に最も相図性であるヒト抗体が選ばれるであろう。運んだヒト抗体は鎖及び重鎖受容体配列の両者を提供するであろう。実際、ヒト *Ea* 抗体がこの機能を提供することがよく見い出されている。

いかにしてドナー免疫グロブリンを選ぶかにかかわらず、受容体よりもむしろ供与体中のその位置のアミノ酸と同じなるようにヒト化免疫グロブリン鎖のフレームワーク中の少數のアミノ酸を選ぶことによって、より高い親和力を獲得することができる。第2の原理は、どのアミノ酸が供与体から選ぶかを規定する以下のカテゴリである。詳しくは、これらのカテゴリのうちの1つに属するほとんどのアミノ酸は全てのアミノ酸位置において、供与体アミノ酸は事实上

選ばれるであろう。

カテゴリリー-1： CDRにおけるアミノ酸の位置は Kabat ら、前掲に定義されている。

カテゴリリー-2：ヒト受容体免疫グロブリンのフレームワーク中のアミノ酸が、普通でない（即ち「まれである」；本明細書中で使用されるこの用語は、代表的なデーターベンク中のヒト重鎖（対応の重鎖）V領域配列の約20%以下、しかしながら通常は約10%以下しかその位置に存在しないアミノ酸を示す）場合、そしてその位置の供与体アミノ酸がヒト配列に典型的である（即ち「一般である」；本明細書中で使用されるこの用語は、代表的なデーターベンク中の約25%以上、しかしながら通常は50%以上の配列に存在するアミノ酸を示す）場合、受容体よりもむしろ供与体アミノ酸が選択されるだろう。この基準は、ヒトフレームワーク中の普通でないアミノ酸が抗体構造を破壊しないことを保証するのに役立つ。更に、一般でないアミノ酸をまたまヒト抗体に典型的である供与抗体からのアミノ酸で置換することにより、ヒト化抗体を低免疫原性にすることができる。

全てのヒト重鎖及び重鎖可変領域配列はそれぞれ、互いに対しても相図性であり、且つ、一定の基準の位置 (Kabat ら、前掲) にて同一のアミノ酸を有する配列の「サブグループ」に分類される。ヒト受容体配列中のアミノ酸がヒト配列の中で「まれ」又は「一般」であるかを決定するととき、受容体配列と同じサブグループにおけるそのヒト配列のみを考慮することがしばしば好ましいであろう。

カテゴリリー-3：ヒト化免疫グロブリン鎖中の3つの CDR のすぐ近くの位置において、受容体アミノ酸よりもむしろ供与体アミノ酸が選択されるだろう。それらのアミノ酸は、おそらく特に CDR 中のアミノ酸と相互作用し、もし受容体から選択されれば供与体 CDR を破

壊しそして親和力を低下させるであろう。更に、近隣のアミノ酸は抗原と直接相互作用し (Amit ら、*Science*, 233, 741-753 (1986))、供与体からそれらのアミノ酸を選択することは元の抗体における親和力を提供する全ての抗原接觸を維持するに望ましいかもしれない。

カテゴリリー-4：典型的には元の供与抗体の3次元モデルは、CDR の外側の幾つかのアミノ酸が CDR に接しておらずして水素結合、ファンデルワールス力、疎水的相互作用等により CDR 中のアミノ酸と相互作用する相当な確率を有することを示す。それらのアミノ酸位置では、受容体免疫グロブリンアミノ酸よりもむしろ供与体アミノ酸が選択される。この基準に従ったアミノ酸は、通常は CDR 中の或る部位の約3人単位内に側鎖原子を有し、そして確立された化学的力、例えば上記に列挙した力に従って CDR 原子と相互作用することができる原子を含まなければならない。

水素結合を形成しうる原子の場合、この3人はその原子簇の間で測定されるが、しかしながら結合を形成しない原子に関しては、この3人はそれらのファンデルワールス表面間で測定される。従って、後者の場合、相互作用が可視と考えられる原子に関して、その原子簇は約6人以内 (3 + ファンデルワールス半径の合計) であろう。ほとんどの場合、原子簇は4又は5~6人離れている。アミノ酸が CDR と相互作用できるかの決定のうえで、重鎖CDR2の最後の8個のアミノ酸を CDR の一部と考えることが好ましく、なぜなら構造上の見地より、これらの8個のアミノ酸はフレームワークの一部としてよりふるをうからである。

CDR 中のアミノ酸と相互作用でき、そしてそれ故カテゴリリー-4に属するフレームワーク中のアミノ酸は別の方で区別できる。各フレームワークのアミノ酸の溶剤の接近可能な表面積は2つの方法、

即ち、(1) 完全抗体において、及び(2) その CDR の除去された抗体より成る理化分子、において計算される。これらの値の間での約10平方人又はそれより大きい有意差は、フレームワークのアミノ酸の溶剤への接近が CDR により少なくともある程度ブロックされ、そしてそれ故このアミノ酸が CDR と接触していることを示す。アミノ酸の溶剤接近可能表面積は、当業界において既知の計算法を利用して、抗体の3次元モデルに基づいて計算される (例えば Connolly の *J. Appl. Cryst.*, 16, 548 (1983) 及び Lee と Richards の *J. Mol. Biol.*, 55, 379 (1971))。フレームワークのアミノ酸は、CDR と接觸する別のフレームワークアミノ酸のコンホメーションに影響を及ぼすことによって CDR 間接的に相互作用することも時折ある。

フレームワーク中のいくつかの位置でのアミノ酸、特に重鎖の位置 2, 48, 64 及び 71、並びに重鎖の 26~30, 71 及び 94 (番号付けは Kabat ら、前掲に従う) のそれは数多くの抗体 (Chothia と Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196, 901 (1987)) と相互作用することができる事が知られており、それ故これらのアミノ酸は一般にカテゴリリー-4 に属するであろう。典型的には、本発明のヒト化免疫グロブリンはこれらに加えてカテゴリリー-4 に属する (異なる) 供与体アミノ酸を含むであろう。重鎖における位置 35、並びに重鎖における 93 及び 103 のアミノ酸も CDR と相互作用するようである。これらの番号の位置の全てでは、ヒト化免疫グロブリンとなるように受容体アミノ酸よりもむしろ供与体アミノ酸 (それらが異なるとき) の選択が好ましい。他方、カテゴリリー-4 に属しうる一定の位置、例えば重鎖の最初の5個のアミノ酸が、ヒト化免疫グロブリンにおける親和力を失わせずに受容体免疫グロブリンから時折り選ばれる。

Chothia と Lesk (前掲) は Kabat ら (前掲) とは異なる CDR を決定している。特に、CDR1 は 26~32 の残基数を含むと決定されている。

特表平6-503963 (10)

従って、Biecheleら(前掲)はこれらのアミノ酸を供与体免疫グロブリンから説いている。

タンパク質、例えば抗体のモデルを作るためのコンピュータープログラムは一般に入手でき、そして当業者によく知られている(Leryら、*Biochemistry* 28, 7168-7175 (1989); Brucocerriら、*Nature*, 335, 564-568 (1988); Chotklaら、*Science*, 239, 755-758 (1988)を参照のこと)。これらは本発明の一節を構成していない。事実、全ての抗体は類似の構造を有するため、ブルックヘーブン・プロテイン・データー・バンクより入手できる既知の抗体の構造が、他の抗体の大まかなモデルとして必要ならば利用されうる。市販のコンピュータープログラムは原子間の距離を計算するため、及び異なるアミノ酸が相互作用する傾向を評価するため、これらのモデルをコンピューターモニターに表示するのに利用できる(Perrinら、*J. Mol. Graphics*, 6, 13-27 (1988)を参照のこと)。

ヒト化免疫グロブリンにおけるアミノ酸を供与体から取る場合を記載した上記のカナブリーに加えて、ヒト化免疫グロブリンにおける一定のアミノ酸は、もしそれらが下記に属するなら、供与体又は受容体以外から取ることができる：

カナブリー5：供与体免疫グロブリン中の一定の位置のアミノ酸が前記で定義したようにヒト配列にとて「まれ」であり、且つ、受容体免疫グロブリン中のその位置でもそのアミノ酸が「まれ」であるなら、ヒト化免疫グロブリン中のその位置でのアミノ酸はヒト配列の「典型的」ないくつかのアミノ酸となるよう選ばれうる。好ましい選択は受容体配列と同じサブグループに属する既知のヒト配列において知られているその位置にてよく存在しているアミノ酸である。

ヒト化抗体は一般に、ヒトの治療における利用に因して、マウス

よりも、又はある場合においてはキメラ抗体よりも少なくとも3つの有用な利点を有している：

1) エフェクター機能がヒトであるため、これはヒト免疫系の他の部分によく相互作用しうる(例えば、補体-依存性細胞障害性(CDC)又は抗体-依存性細胞障害性(ADCC)によって標的細胞をより効率的に破壊する)。

2) ヒト免疫系は異物のようにヒト化抗体のフレームワーク又は定常領域を認識せず、従って注射した抗体に対する抗体応答は、全体的に外來性であるマウス抗体又は部分的に外來性であるキメラ抗体に対するそれより低いであろう。

ある観点において本発明は、受容体ヒトフレームワーク領域をコードするDNAセグメントに連結された、所望の抗原、例えばヒトIL-2受容体に結合することのできる供与体免疫グロブリンに由来する重鎖及び軽鎖CDRをコードする組換えDNAセグメントを発見せしめることによって生産されるヒト化免疫グロブリンの設計に関する。本発明に従って設計された例示的なDNA配列は、図1～4に示す重鎖及び軽鎖CDRと実質的なヒトフレームワーク領域を含んで成るポリペプチド鎖をコードする。コドン組合及び重要でないアミノ酸置換箇に基づき、下記に詳細のとおり、その他のDNA配列がこれらの配列に容易にとて代わることができる。一般に、本発明の基準は実質的に任意のヒト化免疫グロブリンを設計するのに有用である。

前記DNAセグメントは、典型的には、ヒト化免疫グロブリンのコード配列に作用可能に連結した発現調節DNA配列、例えば天然由来のまたは異種のプロモーター領域、を更に含むだろう。好ましくは発現調節配列は、真核生物宿主細胞を形質転換またはトランسفェクションせしめることができるベクター中の真核生物プロモーター系であろうが、原核生物宿主用の調節配列を用いることができる。

ベクターが適当な宿主中に組み込まれれば、宿主はスクレオチド配列の高レベル発現に適当な条件下で維持され、そして所望する時、軽鎖、重鎖、軽鎖/重鎖二重鎖もしくは完全な抗体、結合性断片または他の免疫グロブリン形態の収得および複製を行うことができる(S. BaychickのCells of Immunoglobulin Synthesis. Academic Press, N.Y., (1979)を参照のこと)。

ヒト定常領域DNA配列は、周知の方法に従って、種々のヒト細胞から、好ましくは不死化されたB細胞から単離することができる(Kabat、前掲およびWP 87/02671を参照のこと)。本発明の免疫グロブリンを作製するためのCDRは、所望の抗原(例えばヒトIL-2レセプター)に結合することができるモノクローナル抗体から同様にして得られる。そしてマウス、ラット、ウサギまたは抗体を生産することができる他の脊椎動物を含む任意の便利な哺乳動物起源において生産されるだろう。定常領域及びフレームワークDNA配列の適当な起源細胞並びに免疫グロブリンの発現および分離のための宿主細胞は、多種の入手源、例えばアメリカン・タイプ・カルチャーレ・コレクションから入手することができる("Catalogue of Cell Lines and Hybridomas", 第5版 (1985) Rockville, Maryland, U.S.A.)。

本明細書中に特定期に記載のヒト化免疫グロブリンに加えて、他の「実質的に相同的」改良免疫グロブリンを容易に設計することができる、そして当業者に周知の様々な組換えDNA技術を使って製造することができる。例えば、フレームワーク領域は幾つかのアミノ酸置換、末端および中間の付加および削除等により一次構造レベルで図1～図4の配列と異なることができる。更に、本発明のヒト化免疫グロブリンを基準として、種々の異なるヒトフレームワーク領域を単独でまたは組合せて用いることができる。一般に、遺伝子の修

飾は種々の周知の技術、例えば部位特異的突然変異誘発(GillemanおよびSalth, *Gene* 8: 81-97 (1979)並びにRobertsら、*Nature* 328: 731-734 (1987)を参照のこと)により容易に達成することができる。実質的に相同的免疫グロブリン配列は対照の免疫グロブリンタンパク質と少なくとも約85%の相同性、通常は少なくとも90%、そして好ましくは少なくとも約95%の相同性を示すものである。

あるいは、一次抗体構造の一部分のみを含んで成るポリペプチド断片を製造することができ、この断片は1または複数の免疫プロブリン活性(例えば補体結合活性)を有する。これらのポリペプチド断片は当業界に周知の方法による完全抗体のタンパク質分解により製造するか、又は部位特異的突然変異誘発を利用して停止コドンを所望の位置、例えばCB1の後に挿入してFab断片を作るか、もし(はヒンジ領域の後に挿入してFab')断片を作ることができる。一本鎖抗体はVL及びVHをDNAリンクマーにつなげることによって製造できる(Watsonら、前掲及びBirdら、前掲を参照のこと)。また多数の遺伝子と同様、免疫グロブリン関連遺伝子は、各々が1または複数の別個の生物活性を有する別々の機能性領域を含むため、該遺伝子を別の遺伝子からの機能性領域(例えば酵素; 1987年12月15日提出の一般公報されたU.S.S.R. 132,387を参照のこと)と結合させ、新規性質を有する融合タンパク質(例えば免疫毒素)を製造することができる。最終的に所望のヒト化抗体を発現することができる本発明の法故配列は、種々な異なるポリヌクレオチド(ゲノムまたはcDNA、RNA、合成オリゴヌクレオチド等)および成分(例えばV、J、DおよびC領域)から、そして種々な異なる技術により、形成せしめることができる。適当な合成及びゲノム配列を連結することができる現在最も一般的な製造方法であるが、cDNA配列を使用してもよい(ヨーロッパ特許公報No 0239400およびL.Belchereら、*Nature*

特表平6-503963 (11)

132: 323-327 (1987) を参照のこと)。

前に述べたように、該 DNA配列を発現調節配列に作用可能に連結した(即ち、機能を保証するように配置させた)後で該配列が宿主内で発現されるだろう。それらの発現ベクターは、典型的にはエピソームとしてまたは宿主染色体 DNAの組込み部分として宿主内で複製可能である。一般に、発現ベクターは、所望の DNA配列により形質転換された細胞の検出を可能にするために選択マーカー、例えばテトラサイクリンまたはネオマイシンのそれを含むだろう(例えば、米国特許第4,704,362号を参照のこと)。

大腸菌 (*E. coli*) は本発明の DNA配列をクローニングするのに特に有用な原核生物宿主である。使用に適当な他の微生物宿主としては、バクテリス属、例えばバクテリス・チブチリス (*Bacillus subtilis*)、並びに他の細胞内細菌、例えばサルモネラ属 (*Salmonella*)、セラチア属 (*Serratia*) および種々のシードモナス属 (*Pseudomonas*) 種が挙げられる。それらの原核生物宿主では、典型的には宿主細胞と適合性である発現調節配列(例えば複製開始点)を含むであろう発現ベクターを作製することもできる。加えて、任意の数の種々の周知のプロモーター、例えばラクトースプロモーター系、トリプトファン (*trp*) プロモーター系、β-ラクタマーゼプロモーター系、またはメタバージからのプロモーター系が存在するだろう。プロモーターは、典型的には所望によりオペレーター配列と共に発現を調節し、そして転写および翻訳を開始および終了させるためのリボソーム結合部位等を有するだろう。

他の微生物、例えば酵母を発現に用いることもできる。ラッカロミセス (*Saccharomyces*) は好ましい宿主であり、発現調節配列、例えば3-ホスホグリセレートキナーゼ又は他の解糖酵素プロモーターを含むプロモーター、並びに所望により複製開始点、終結

配列等を有する適当なベクターを有している。

微生物に加えて、哺乳動物組織細胞培養物を用いて本発明のポリペプチドを発現および生産せしめることもできる (Winnacker, "From Genes to Clones", VCH Publishers, N.Y., N.Y. (1987) を参照のこと)。完全な免疫グロブリンを分泌することができる多数の適当な宿主細胞系が技術の現状において開発されているため実際は真核細胞が好ましい。そのような真核細胞としては、CHO細胞系、種々の COS細胞系、HeLa細胞、好ましくはミエローマ細胞系及び形質転換されたB細胞またはハイブリドーマが挙げられる。それらの細胞のための発現ベクターは、発現調節配列、例えば複製開始点、プロモーター、エンハンサー (Queen, C. ら、*Isogenol. Rev.*, 89: 49-68 (1986))、および必要なプロセシング情報部位、例えばリボソーム結合部位、RNAスプライス部位、ポリアデニル化部位、および転写ターミネーター配列を含むことができる。好ましい発現調節配列は、免疫グロブリン遺伝子、SIV、アデノウイルス、サイトメガロウイルス、ウシ乳頭瘤ウイルス等に由来するプロモーターである。

著目の DNAセグメント(例えば、遺伝および軽鎖コード配列並びに免疫調節配列)を含むベクターは、宿主細胞のタイプに依存して異なる周知の方法により、宿主細胞中に移入することができる。例えば、原核細胞には塩酸カルシウムトランクション法が常用され、一方他の細胞宿主にはリン酸カルシウム処理またはエレクトロポレーションが使用される(一般には、Hesseltineら、*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1982) を参照のこと)。

一度発現されれば、本発明の完全抗体、それらの二量体、個々の軽鎖および遺伝、または他の免疫グロブリン形態を商業界の標準法、

例えば狂犬アンモニウム沈淀、アフィニティーカラム、カラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動等に従って精製することができる(一般的には、Scopes, B., *Protein Purification*, Springer-Verlag, N.Y. (1982) を参照のこと)。少なくとも約90~95%均質の実質的に純粋な免疫グロブリンが好ましく、98~99%またはそれ以上の均質が医療用に好ましい。部分的にまたは所望の時には均質まで精製されれば、原核的に(体外的を含む)またはアッセイ方法、免疫萤光染色法等を開発しそして実施する際に該ポリペプチドを使用することができる(一般的には、*Immunological Methods*, 第1および2巻、LeftkowitzおよびPernia編、Academic Press, New York, N.Y. (1979および1981) を参照のこと)。

本発明の好ましい医薬組成物は、免疫毒素における1又は複数の当該抗体の使用を含んで成る。免疫毒素は2つの成分により特徴づけられ、そして試験管内または生体内において活性細胞を殺すのに特に有用である。第一成分は、付着または吸収すると細胞に対して通常は致命的である細胞毒性物質である。「デリバリー試薬剤」として知られる第二成分は、毒性物質を特定の細胞タイプ、例えばガンを含む細胞に供給するための手段を提供する。この2成分は通常は種々な周知の化学的方法のいずれかによって一緒に化学的に結合される。例えば、細胞毒性物質がタンパク質でありそして第二成分が完全な免疫グロブリンである時、結合は異種二価性架橋剤、例えばSPDP、カルボジイミド、グルタルアルデヒド等によることができる。種々の免疫毒素の製造が商業界で周知であり、例えば"Monoclonal Antibody-Toxin Conjugates: Aiming the Magic Bullet", Thorpe ら、*Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine*, Academic Press, 168-190 (1982) 中に見つけることができる。該成分は遺伝子的に結合させることもできる(Chaudharyら、*Nature* 339, 394 (1989) 参照)。

種々な細胞毒性物質が免疫毒素における使用に適当である。細胞毒性物質としては、放射性核種、例えばヨウ素-131、イットリウム-90、リニウム-188 およびビスマス-212 又はその他のアルファ線放射物質: 多数の化学療法剤、例えばビンデシン、メトトレキセート、アドリアマイシンおよびシスプラチニン; 並びに細胞毒性タンパク質、例えば、リボソーム阻害タンパク質様アミカヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質、シードモナス外毒素A、リシン、ジフテリア毒素、リシンA類等; または細胞表面で活性な物質、例えばホスホリバーゼ酵素(例えばホスホリバーゼC)を挙げることができる。(1990年7月26日に提出された WO 90/07861; "Chimeric Toxins", Okunae やび Phili, *Pharmac. Ther.*, 25: 355-381 (1982); 並びに "Monoclonal Antibodies for Cancer, Detection and Therapy", Baldwin やび Byers編、169-179, 224-266頁、Academic Press (1983) を参照のこと。)

免疫毒素のデリバリー成分は、本発明のヒト化免疫グロブリンを含むだろう。好ましくは完全な免疫グロブリンまたはそれらの結合性断片、例えばFabが使用される。典型的には、免疫毒素中の抗体はヒト IgGまたはIgG1サブタイプのものであるだろう。しかし所望の時には他の哺乳動物遺伝組成物を用いることもできる。

ヒト化抗体およびその医薬組成物は、特に非経口、即ち皮下、筋肉内または静脈内投与に有用である。非経口投与用組成物は、通常、許容される巨体、好ましくは水性担体中に溶解された免疫グロブリンの溶液または混合物を含んで成るだろう。種々な水性液体、例えば水、緩衝化された水、0.4%食塩水、0.3%グリシン等を使用することができる。それらの浓度は無菌であり、通常は粒状物質を含まない。それらの組成物は、常用される周知の滅菌技術により滅菌することができる。該組成物は、適切な生理的条件に必要である。

特表平6-503963 (12)

る時は医療上許容される補助物質、例えばpH調整剤および緩衝剤、毒性調整剤等、例えば酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、乳酸ナトリウム、ヒトアルブミン等を含有することができる。これらの組成物中の抗体の濃度は広範囲に渡り異なることができ、即ち、少なくとも約0.5%未満から、通常は少なくとも約1%から、15~20重量%ほどまでに及ぶことができ、そして液体の体積、粘度等に主として基づいて、選択された特定の投与形式に従って選択されるだろう。

従って、注射用の典型的医薬組成物は、1mlの無菌緩衝液と1~10mgの免疫グロブリンを含むように調製することができる。静脈点滴注入用の典型的医薬組成物は、250mlの無菌リンガー液と150mgの抗体を含むように調製することができる。非経口投与可能な組成物の実際の調製方法は当業者に既知であるかまたは明白であり、そして例えばRemington's Pharmaceutical Science、第15版、Hoechst Publishing Company, Easton, Pennsylvania (1980) 中に詳細に記載されており、これは参考として本明細書中に組み込まれる。

本発明の抗体は肝臓のために凍結乾燥することができ、そして使用前に適切な液体中で再構成することができる。この技術は従来の免疫グロブリンに関して効果的であることが示されており、当業界で既知の凍結乾燥および再構成技術を用いることができる。凍結乾燥と再構成は様々な程度の抗体活性の低下をもたらし得ること(例えば従来の免疫グロブリンでは、IgG抗体はIgG抗体よりも大きな活性低下を有する傾向がある)、そして使用レベルを調整して想め合わせなければならないことがあることは、当業者により明白であろう。

本発明のヒト化抗体またはその混合物を含有する組成物は、予防および/または治療処置のために投与することができる。治療用

途においては、組成物は、既に病気にかかっている患者に、病気を治療するかまたは少なくとも部分的に緩和するのに十分な量で投与される。これを達成するのに適切な量は「治療的有効量」と定義される。この用途に有効な量は、感染の重度および患者自身の免疫系の一般状態に依存するであろう。しかし通常は、用量あたり約1~約200mgの抗体、より詳ましくは患者あたり5~25mgの用量が使用されるだろう。本発明の材料は通常は深刻な病状、即ち命にかかるかまたはもしかすると命にかかる状況において使用されるだろうことを念頭に置かなければならない。そのような場合、本発明のヒト化抗体により造成される外来性物質の最小化および「外来物質」拒絶の確率の点からみて、実質的過剰量の抗体を投与することが可能でありそして治療医により望ましいと感じられるかもしれない。

予防用途においては、本免疫グロブリンまたはその混合物を含有する組成物は、患者の抵抗性を高めるためにまだ病状でない患者に投与される。そのような量は「予防的有効量」として定義される。この用途の場合、正確な量は患者の健康状態および免疫の一般レベルに依存するが、通常は用量あたり0.1~25mgであろう。

又は該組成物の投与は処置する医師により選択される用量レベル及びパターンに従って実施される。あらゆる状況において、該医薬剤は患者を有効に処置せしめるのに十分な量の本発明の抗体を提供すべきである。

診断目的に、抗体を標識してもよくまたは未標識であってもよい。未標識抗体は、ヒト化抗体と反応性である別の標識抗体(二次抗体)、例えばヒト免疫グロブリン正常領域に特異的な抗体と組合せて使用することができる。あるいは抗体を直接標識してもよい。様々な標識、例えば放射性核種、蛍光团、酵素、酵素基質、酵素補因子、酵

素阻害剤、リガンド(特にハプテン)、等を使用することができる。多数の型式のイムノアッセイが利用可能であり、そして当業者に周知である。

以下の実施例を限定しない例示の目的のために提供する。

5つの特定のヒト化抗体の製造を以下に説明する。これらの抗体は、ヘルペス單純ウイルスのgB及びgD糖タンパク質(Hetsellら、*Intervirology* 29, 39 (1988))にそれぞれ結合するFd79及びFd138-80、CD33抗原に結合するM195(Tanigotoら、*Laskamia* 3, 339 (1989)、IL-2レセプターのp75鎖に結合するmik-B1(Tusdoら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 1982 (1989)、並びにサイトメガロウイルスのgB糖タンパク質に結合するCH75である。

基本的には、各抗体の重鎖及び軽鎖可変ドメイン遺伝子に関するcDNAは、アンカー化ボリメラーゼ連鎖反応(Lobら、*Science* 243, 219 (1989))により、定常領域にハイブリダイズし、且つ、*Bind*Ⅱ部位を含んでいる3'プライマーと、4Gテールにハイブリダイズし、且つ、*Eco*RI部位を含んでいる5'プライマーを利用してクローニングした(図6において手法を示す)。シーケンシングのため、このPCR増幅断片を*Eco*RI及び*Bind*Ⅱによって消化し、次いでpUC18ベクターの中にクローニングした。各抗体に関して、少なくとも2本の重鎖及び2つのカッパークローニングをシーケンス化し、そして同一の配列を有していることが認められた。成熟の経及び重鎖可変領域の推定アミノ酸配列を図1~5の上行に示す。

ヒト化抗体の高い結合親和力を維持するため、抗体を設計するときに前記の原理及びカテゴリーを採用した。高い配列相似性に基づき、マウス抗体に受容体の軽及び重鎖ヒトフレームワークの両方を提供するのに以下のヒト抗体を選択した: Fd79のためにヒトPoc、Fd138-80のためにヒトEu、M195のためにヒトEu、mik-B1のために

ヒトLay、そしてCH75のためにヒトWol。

各マウス抗体の可変領域のモデルを作製するためにコンピュータープログラム ABM0D及びBMCAD (Levittの *J. Mol. Biol.*, 169, 595 (1983) 及びZiblerら、*Biochemistry* 29, 10032 (1990)) を用いた。このモデルは、CDRに十分に密接してそれらと有効に相互作用する各フレームワーク中のアミノ酸を決定するために利用した。各抗体に関して、前記のカテゴリー(1)~(5)に属することが認められた位置を、図1~5の番号付けに従い、表1に示す。

カテゴリー	Fd79抗体	
	軽鎖	重鎖
1	24~38, 54~56, 93~100	31~35, 50~66, 99~111
2	9, 45, 46, 83	82, 112
3	53	112
4	53	97
5	81	

カテゴリー	Fd138-80抗体	
	軽鎖	重鎖
1	24~34, 50~56, 89~97	31~35, 50~66, 99~110
2	48, 63	93, 98, 111, 112, 113, 115
3	..	30, 67, 98, 111
4	36, 48, 87	21, 30, 37, 48, 67, 68, 98

特表平6-503963 (13)

表 1 (続き)

M195抗体

カテゴリ	経 領	重 領
1	24-38, 54-60, 93-101	31-35, 50-66, 95-105
2	10, 52, 67, 110	93, 95, 98, 106, 107, 108, 110
3	-	30, 67, 98, 106
4	40, 52, 74	27, 30, 48, 68, 98

mik-β1抗体

カテゴリ	経 領	重 領
1	24-33, 49-55, 88-96	31-35, 50-65, 98-108
2	13	84, 89, 90
3	-	30, 49
4	70	29, 30, 72, 73
5	41	1

CHV5抗体

カテゴリ	経 領	重 領
1	24-34, 50-56, 89-97	31-35, 50-66, 99-108
2	-	69, 80
3	49	30
4	49	24, 27, 28, 30, 97
5	-	5

各ヒト化抗体を設計するうえで、その位置が、マウス供与体配列に由来するアミノ酸を用いる場合であるカテゴリー(1)～(4)に属しない限り、又はその位置においてヒト配列にとって典型的なアミノ酸を利用する場合であるカテゴリー(5)に属しない限り、ヒト受容体配列のアミノ酸と同じになるそれを各位置にて選択した。

ヒト化抗体についての遺伝子の作製のため、ヒト化量及び残基のランバク質配列をコードし、マウス抗体に典型的に由来するシグナルペプチドを含み、マウス配列において見い出せるコドンを一般に利用するスクレオチド配列を選択した。制限部位を作るため、又は所望されないものを除去するため、複数の組合コドンを変化させた。このスクレオチド配列は更に免疫グロブリン遺伝子にとって典型的なスプライスドナーシグナル及び各端にて *Xba*I 部位を含む。各可変ドメイン遺伝子に関して、交互の個の上の 2 対の重複オリゴスクレオチドであって、コード化配列全体並びにシグナルペプチド及びスプライスドナーシグナルを包括するものを合成した。このオリゴスクレオチドは Applied Biosystems 380B DNA 合成装置で合成した。各オリゴは約 110-140 基基の長さであり、15-20 基基の重複を有する。二本鎖 DNA 断片は、各対のオリゴスクレオチドから、クレノウもしくは *Taq* ポリメラーゼ、又はシーケナーゼにより合成し、制限酵素により消化し、pUC18ベクターの中にリゲートし、そしてシーケンス化した。それぞれ正確な半配列を有する 2 本の断片を次に pVg1 (Fd79 及び Fd138-80 の重複) 又は pVg1-dbf1r (M195, mik-β1, CHV5 の重複) 又は pVg (全ての重複) の発現ベクターの *Xba*I 部位へ、完全な重複及び残基遺伝子を作るのに適切な方向においてリゲートさせた。反応は当業界に周知の条件のもとで実施した (Maniatis ら、前掲)。

重複及び残基プラスミドをエレクトロボレーションにより Sp2/0 マウスミエロマーマ細胞へとトランسفェクトし、そして cDNA 発現に関する細胞を選別した。ELISA によって培養上清液中のヒト抗体生産をアッセイすることによってクローニングをスクリーンし、次いで最も生産性クローニングから抗体を精製した。組織培養上清液をスタディコッカスプロテイン A セファロース CL-4B (ファルマシア)

のカラムに通すことによって抗体を精製した。結合した抗体を 0.2 M のグリシン-HCl, pH 3.0 で溶離させ、そして 1 M のトリス、pH 8.0 で中和した。PD10カラム (ファルマシア) に通すことによって粗画液を PBS に交換した。

ヒト化抗体の、対応の抗原を発現するタイプの細胞への結合性を試験した： Fd79 及び Fd138-80 に対する BSV-感染化細胞、M195 に対する 937細胞、mik-β1 に対する YTJB細胞及び CHV5 に対する CHV-感染化細胞。蛍光比色法により、ヒト化抗体は元のマウス抗体及び間違のキメラ抗体とほぼ同程度に結合した。更に、ヒト化抗体は細胞に対する結合に関して、同種のマウス抗体とほぼ同程度に放射性標識化マウス抗体に対して競合し、従ってこのヒト化抗体はマウス抗体とほぼ同じ結合親和力、典型的には約 2 倍以内又はそれより優れた親和力を有する (例えば表 2 を参照のこと)。

表 2

ネズミ及びヒト化抗体の結合親和力

	マウス K. (M ⁻¹)	ヒト化 K. (M ⁻¹)
Fd79 (抗-αB)	1.1 × 10 ⁶	5.3 × 10 ⁷
Fd138-80 (抗-αD)	5.2 × 10 ⁷	4.8 × 10 ⁷

以上より、本発明のヒト化免疫グロブリンは他の抗体よりも多くの利点を提供することが認められる。他のモノクローナル抗体と比べ、本ヒト化免疫グロブリンはより経済的に生産でき、そして実質的に少ない外来性アミノ酸残基を含みうる。ヒト患者に注射された後のこの低められた抗原性の傾向は有意な治療改善を示す。

各ヒト化免疫グロブリンの詳細な説明を続ける。

例 1

p75に対するヒト化免疫グロブリン

哺乳動物において、免疫応答は外来物質、即ち、抗原に特異的に相互作用する 2 タイプの細胞により媒介される。これらの細胞タイプのうちの 1 つ、B-細胞は、抗体の生産のもととなる。第 2 の細胞のクラス、T 細胞は、両 B 細胞の生体内機能を調節する広範囲にわたる細胞サブセット及び T 細胞を含んでいる他の広範囲にわたる造血細胞を含む (一般に、Pawl, H.B. 編、*Principles of Immunology* 第 2 版、Raven Press, New York (1989) を参照のこと)。

T 細胞がこの調節を及ぼす一筋目は、インテロイキン-2 (IL-2) として知られ、もとは T-細胞成長因子と呼ばれていたリンキカインの生産を介する。IL-2 の主機能は T 細胞の刺激及び維持にあるようである。事実、数人の免疫学者は IL-2 が全免疫応答の中心にあると信じている (Farrar, J. ら、*Immunol. Rev.*, 61, 129-166 (1982))。

その生物学作用を及ぼすため、IL-2 は特定の高親和力膜レセプターに相互作用する (Greene, W. ら、*Progress in Hematology* XIV, B. Brown 編、Grune and Stratton, New York (1986), 頁 283ff. 及び Waldmann, *Annu. Rev. Biochem.*, 58, 875 (1989))。ヒト IL-2 レセプターは複雑な多量鎖タンパク質であり、その一員は、Tac ベチド又はアルファ-1 として知られ、約 55kD のサイズである (Leonard W ら、*J. Biol. Chem.*, 260, 1872 (1985) を参照のこと)。この第 2 類は p75 又はベータ-1 として知られている (Friede ら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 9694 (1986) 及び Sharot ら、*Science* 234, 859 (1986))。p55 又は Tac 頭及び p75 頭はそれぞれ独立して又は中和力で IL-2 と結合し、一方両頭の IL-2 レセプター複合体は高親和力で IL-2 と結合する。ヒト IL-2 レセプターの

特表平6-503963 (14)

p75様はしばしば本明細書中でp75タンパク質と簡単に呼ばれてい
る。

ヒトIL-2レセプターの構造及び機能の説明のほとんどは特異的
な反応性のモノクローナル抗体の開発に基づく。特に、抗-Tacとして知られているあるマウスモノクローナル抗体(Uchiyamaら、*Immunol.* 126, 1393 (1981))は、IL-2レセプターがT細胞上だけでなく、単球マクロファージ科の細胞、肝臓のクッパー細胞、皮膚のランゲルハンス細胞、そしてむろん活性化T-細胞上でも検出されうことを示すために利用されている。重要なこととして、休止T-細胞、B-細胞又は循環マクロファージは典型的にはIL-2レセプターを示さない(Hermannら、*J. Exp. Med.* 162, 1111 (1985))。他の抗体、mik-β1はp75様に結合する(Faudoら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 1982 (1989))。

抗-Tacモノクローナル抗体もIL-2相互作用を必要とするリンパ球機能を決定するために利用されており、そして細胞培養物中に細胞毒性和抑制Tリシン球を発生せしめることを含む様々なT-細胞機能を阻害することが示されている。更に、抗-Tac及びその他の抗体による試験に基づき、様々な疾患、特に成人T細胞白血病が、T細胞による不適切なIL-2レセプター発現に現状関連している。

より最近になり、IL-2レセプターはT細胞により媒介される障害への新規の治療手法に関する真の標的であることが示された。IL-2レセプター特異的抗体、例えば抗-Tacモノクローナル抗体又はmik-β1は、IL-2レセプターを抱える細胞を効率的に除去するため単独で、又は免疫コンジュゲート(例えばリシンA、アイソトープ等との)として利用されうることが提唱されている。これらの因子は病気状態に関与する例えばIL-2レセプター発現性白

血病細胞、一定のB-細胞、又は活性化T-細胞を理屈的に消失させ、且つ、必要とされる正常なT-細胞免疫応答を高めることができることを確実にするために成熟正常T-細胞及びその前駆体の維持を可能とすることができる。一般に、ほとんどのその他のT-細胞特異的因子は本質的に全ての未梢T-細胞を破壊してしまうことができ、これはこの因子の治療効果を制限する。全体的に、IL-2レセプターに対して特異的な適当なモノクローナル抗体の利用は活性化T-細胞による自己免疫障害、器官移植及び任意の望ましくない応答において治療的用途を有しうる。事実、例えば抗-Tac抗体を利用する臨床試験が開始されている(Firkinら、*Transplant. Proc.* 21, 1766 (1989) 及び Waldmannら、*Blood* 72, 1805 (1988))。

残念ながら、抗-Tac、mik-β1及びその他の非ヒトモノクローナル抗体の利用は、特に以下に説明するような反復治療法において一定の欠点を有している。例えばマウスモノクローナル抗体は一般にヒト補体を完全に固定しなく、そしてヒトに利用する際のその他の重要な免疫グロブリン相容特性を欠く。おそらくより重要なのは、抗-Tac、mik-β1及びその他の非ヒトモノクローナル抗体は、ヒト患者に注射されたときに免疫原となりうる大きなアミノ酸の鎖を含まない。

本発明に従い、ヒトIL-2レセプターのp75様に特異的に反応性なヒト標免疫グロブリンを提供する。少なくとも 10^7 ~ 10^8 M⁻¹、そして好ましくは 10^8 M⁻¹~ 10^{10} M⁻¹又はそれより強力な結合親和力を有する免疫グロブリンは例えばIL-2のヒトIL-2レセプターへの結合を阻害することができる。該ヒト標免疫グロブリンはヒト標フレームワークを有し、そして免疫グロブリン、典型的にはp75タンパク質上のエピトープに特異的に反応性なマウス免疫グロブリンに由来する相容性決定領域(CDR)を有することができる。大

量に経済的に生産できる本発明の免疫グロブリンは例えば様々な技術によるヒト患者におけるT細胞媒介障害の処置において利用できる。

一覧点において、本発明はヒトIL-2レセプター上の所望のエピトープに結合可能な免疫グロブリン、例えばmik-β1モノクローナル抗体に由来する量及び/又は軽鎖CDRをコードする組換えDNAセグメントに関する。これらの領域をコードするDNAゲノムは典型的には適当なヒト標フレームワーク領域をコードするDNAセグメントに連結されているであろう。発現によりmik-β1の量及び軽鎖CDRを含んで成るポリペプチド鎖をコードする典型的なDNA配列を図7に示している。コドン構造及び重要なアミノ酸置換に基づき、前記した通りその他のDNA配列が容易にそれらの配列にとって代わることができる。

これらの抗体は典型的には各別にT細胞媒介障害症状の処置において利用されるであろう。一般に、障害に関連する細胞がIL-2レセプターを抱えていることが同定されたとき、IL-2のヒトIL-2レセプターへの結合を阻害できるヒト標抗体が適切となる(U.S.S. No. 085,707、題名“Treating Human Malignancies and Disorders”を参照のこと)。例えば、処置に適する典型的な障害症状には、例えば心臓、肺、腎臓、肝臓等の器管移植を受けた患者における移植対宿主障害及び移植拒絶が含まれる。その他の疾患には、自己免疫障害、例えば1型糖尿病、多発性硬化症、リウマチ型関節炎、全身性エリテマトーデス及び重症筋無力症が含まれる。

本発明のヒト標抗体は別の抗体と、特に疾患のもととなる細胞上の別のマーカーに反応性なヒトモノクローナル抗体と組合せて利用することもできる。例えば、適当なT-細胞マーカーにはファースト・インターナショナル・リューコサイト・ディファレンチエーシ

ョン・ワークショッピングのLeukocyte Typing、Bernardら編、Springer-Verlag, N.Y. (1984) により命名された通称「クラスターの分類」に分類されたものが含まれる。好ましい利用はpSSに結合するヒト様抗体とIL-2レセプターのp75に結合するヒト様抗体、即ち、ヒト化抗-Tac+ヒト化mik-β1による患者の同時処置である。

本発明のヒト標抗体は試験管試験において広範囲にわたる用途が更に見い出せる。例えば、該抗体はT細胞の分類、特定のIL-2レセプター保有細胞もしくはレセプターの断片の単離、ワクチンの製造等のために利用できる。

実験

重複及び軽鎖cDNAのクローニング

重複及び軽鎖可変ドメイン遺伝子に関するcDNAをアンカー化ボリメラーゼ連鎖反応により(E.B. Lobら、*Science* 243, 217 (1989))、定常領域にハイブリダイズされ、且つ、Elaad部位を含む3'プライマーと、5'テールにハイブリダイズされ、且つ、EcoRI部位を含む5'プライマーを用いてクローニングする(図6において手法を示す)。このPCR増幅化断片をシーケンシングのためにEcoRI及びElaadIIにより消化し、次いでpUC19ベクターの中にクローニングした。mik-β1に関しては、2種類のガンマー-2a特異性及び2種類のカッバ-特異性クローニングをシーケンス化した。この2つのガンマー-2aクローニング及び2つのカッバクローニングはそれぞれ配列において同一である。cDNA可変ドメイン配列及びその推定アミノ酸配列を図7に示す。

キメラ抗体の作製及び発現

キメラ抗体遺伝子の作製及び発現のために2種類のプラスミドベクターを削除した。プラスミドpPgk-1-dbsfr(図8A)はヒトサイトメガロウイルスIE1プロモーター及びエンハンサー(H.Boskertら、

特表平6-503963 (15)

Cell 41, 521 (1985))、前方のインtronの一節を含むヒトゲノムC τ 1セグメント、並びに選別のためのジヒドロフォレートリダクターゼ(dbfr)遺伝子(Simonsenら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 80, 2495 (1983))を含む。プラスミドpVK (図8B)はpVgk-dhfrと類似するが、しかしながらヒトゲノムC τ セグメント及びapt遺伝子を含む。n κ - β 1の重鎖及び軽鎖可変領域の誤導体をオリメラーゼ連鎖反応によりcDNAから調製した。5'アライマーはATGコドンにおいて発生するV領域にハイブリダイズしており、そしてXbaI部位を含み; 3'アライマーはJ領域の最後の15個のヌクレオチドとハイブリダイズしており、そしてスプライスドナーシグナル及びXbaI部位を含む(C.Queenら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86, 10029 (1989)を参照のこと)。改変V領域を間違のプラミドベクターのCBVプロモーターと変常領域の部分インtronとの間のXbaI部位の中にクローンした。

キメラ抗体の発現のため、重鎖及びカッパー鎖プラスミドをエレクトロボレーションによってSp2/0マウスミエローマ細胞にトランسفクトし、そしてapt発現のために細胞を選別した。最大量の完全抗体を分離するクローンをELISAにより検定した。精製したキメラn κ - β 1抗体は、フローサイトメトリーにより、p75抗原を発現するT1B細胞に結合することが示された(図9)。

ヒト化抗体のコンピューターモデル化

ヒト化抗体において高結合親和力を維持せしめるため、Queenらの一般手順に従った(C.Queenら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86, 10029 (1989))。ヒト抗体が元のネズミ抗体より相容性であるに従い、ネズミCDRをヒトフレームワークに組合せることによる、親和力を認めうる、CDRへの並みの導入の傾向が下がるであろう。通常、同一のヒト抗体に由来する重鎖及び軽鎖をフレームワーク配列を提供

するために選び、これによりこの2本の鎖を集成するうえでの非適合性の可能性は低まる。配列データーベース(Micro-Genie Sequence Analysis Software (Beckman) により実施)に基づき、抗体Layを、n κ - β 1のヒト化のためのフレームワーク配列を用うために選んだ。

n κ - β 1可変領域のモデルを作製するためにコンピュータープログラムEUCAD (M.Levitt, J.Mol.Biol. 169, 595 (1983))を用いた。このモデルは、CDRに十分に密接していてそれらと有効な相互作用するn κ - β 1フレームワークにおけるアミノ酸を決定するために用いた(以下のカテゴリー4)。ヒト化親及び重鎖n κ - β 1可変領域を設計するには、次の5つのカテゴリーのうちの1つ又は複数に属しない限り、各位置においてLay抗体と同一のアミノ酸を選択した:

(1) その位置がCDRに属した、

(2) その位置では、Layアミノ酸がヒト抗体にまれてあり、一方、その位置では、n κ - β 1アミノ酸がヒト抗体に典型的であった。

(3) その位置がCDRのすぐ近くであった、

(4) 上記したモデルが、そのアミノ酸が抗原結合性領域(CDR)に物理的に近いことを示唆した。

これらのカテゴリーのうちのいくつかの位置に関しては、(マウス)n κ - β 1抗体由来のアミノ酸を用いた。更に、もし位置が下記のとおりであるなら、第5カテゴリーに属する

(5) その位置では、Layアミノ酸がヒト抗体に非常にまれであり、そしてn κ - β 1アミノ酸が異なり、しかもまれである。この場合、その位置ではヒト抗体に典型的であるアミノ酸を用いてよい。

各カテゴリーにおけるアミノ酸を表3に示す。いくつかのアミノ

酸は複数のカテゴリーに属しうる。ヒトn κ - β 1の重鎖及び軽鎖可変ドメインの最終配列を図10に示し、Lay配列と比較する。

表 3

カテゴリ	軽鎖	重鎖
1	24-33, 49-55, 88-96	31-55, 50-65, 98-108
2	13	84, 89, 90
3		30, 49
4	70	29, 30, 72, 73
5	41	1

ヒト化抗体のための遺伝子の作製のため、一般にマウス配列において見い出せるコドンを利用して、マウスのn κ - β 1鎖中と同一のシグナルペプチド(図7)を含むヒト化重鎖及び軽鎖のタンパク質配列をコードするスクレオチド配列を選別した。複数の組合せコドンを変えて、制限部位を作る又は望されないものを除去した。このスクレオチド配列はキメラ遺伝子において利用されているものと同じスプライスドナーシグナル及び各端でのXbaI部位も含んでいた。各遺伝子を4つの重複合成オリゴスクレオチドから作製した。各可変ドメイン遺伝子のため、交互鎖上の2対の重複オリゴスクレオチドを合成し、これは全コード配列並びにシグナルペプチド及びスプライスドナーシグナル(図11)を含んでいた。このオリゴスクレオチドはアブライドバイオシステム380B DNA合成装置で合成した。各オリゴは約110-140の塩基の長さであり、その約20塩基は重複していた。各対のオリゴスクレオチドから二本鎖DNA断片をシーケナーゼにより合成し、制限酵素で消化し、ブルースクリプトII ES(+) (Stratagene)ベクターにリゲートし、次いでシーケンス化した。対応の適切な半配列を有するこの2種の断片を次にpVgk-dhfr又はpVK発現ベクターのXbaI部位にリゲートした。試験内突然変異誘

発を利用して、ヒト化重鎖の位置にて(図10B)スクレオチドCTをAGに変えることにより、オリゴスクレオチドmpaS4により本来コード化されるAlaのアミノ酸をGlu(E)に変えた。反応は当量界によく知られる条件のもとで行った(Maniatisら、前掲)。

重鎖及び軽鎖プラスミドをエレクトロボレーションによってSp2/0マウスミエローマ細胞にトランسفクトし、そしてapt発現のために細胞を選別した。ELISAによって培養上清液中のヒト抗体生産をアッセイすることによりクローンをスクリーンし、そして最良生産クローンから抗体を精製した。抗体は組織培養上清液をスタディロコッカスプロナインA-セファローズCL-4B(ファルマシア)のカラムに通すことによって精製した。結合抗体を0.2Mのグリシン-BSA、pH 3.0により溶離させ、次いで1Mのトリス、pH 8.0で中和した。この緩衝液をPD10カラム(ファルマシア)に通してPBSに交換した。

ヒト化抗体の性質

ヒト化n κ - β 1抗体をネズミ及びキメラ抗体と比較して特性化した。はヒト化抗体は、p75鎖を高レベルで発現するT1B細胞に、フルオロサイトメトリー分析においてキメラ抗体と同様に結合し(図9)、これが同じp75タンパク質を認識することが示唆された。

ヒト化抗体の親和力は放射性ヨウ素化マウスn κ - β 1抗体との競合によって決定した(図12)。結合親和力はBerkofskyの方法に従って計算した(J.A.BerkofskyとI.J.Berkofskyの、Fundamental Immunology (W.E.Paul編), Raven Press (New York), 595 (1984))。ヒト化n κ - β 1抗体の結合親和力はマウスのn κ - β 1抗体の親和力の約2倍以内にあった。

ヒトリンパ球のIL-2刺激増殖を阻害する、ヒト化n κ - β 1+ヒト化n κ -Tac抗体の能力(1990年6月26日公開のWO 90/07861

特表平6-503963 (18)

を参照のこと)を調べた。フィコールーパーク(ファルマシア)による遠心によりヒト血漿から集めたヒト単球細胞を、 RPMI培地+10%の胎児牛血清(FCS)の中に 2×10^6 細胞/mlに希釈した。1/200容量のフィトヘマグルチニンP(ジフコ)を加え、次いでこの細胞を4日間インキュベートした。この細胞をRPMI+10%のFCS+10μ/mlのIL-2の中で更に4日インキュベートした。 10^5 のこのPMA活性芽細胞を次に96穴プレートのウェルにおいて $150\mu l$ のRPMI+10%のFCSの中で1時間、ヒト化gk-β1及びヒト化抗-Tacをそれぞれ $2\mu g$ を待って、又は伴わないで、これに50μlの培地中の種々の希釈率のIL-2(Imgenex)を加えてインキュベートした。この細胞を48時間インキュベートし、 $0.5\mu Ci$ のメチル- 3H -チミジン(Amersham, 82Ci/mmol)を加え、そしてこの細胞を24時間インキュベートした。この細胞を細胞ハーベスターで集め、そして放射活性を測定した。抗体の組合せはIL-2に応答する細胞の増殖を大いに阻止し(図13)、抗体の組合せが強い免疫抑制活性を有することが示唆された。ヒト化gk-β1とヒト化抗-Tacを合わせることは、いづれの抗体単独よりも強力に増殖を阻害した。

例 2

HSV抗原に対するヒト化免疫グロブリン

I型及びII型ヘルペスウイルス(HSV-1及びHSV-2)は現在、世界中での性的伝染障害の2番目に多い原因と考えられている。充実に正確なデーターは入手していないが、感染人は米国の人口の約20-40%に範囲すると見込まれる。無症候性から生命を脅かす数多くの障害にHSV感染が関係している。特定の臨床的分野の中で、HSV-1感染症由来の扁桃炎及び妊娠からその胎児へのHSV-2伝染がしばしば致命的である。免疫抑制患者もこのウイルスに感染したときに重症な合併症にかかる。

これらの免疫グロブリンは例えばHSV伝染から細胞を守ることができます。該ヒト化免疫グロブリンはヒトフレームワークを有しており、そして典型的にはマウス免疫グロブリン、詳しくはgE及びgDタンパク質のようなHSVタンパク質と反応性な免疫グロブリンに由来する又は複数の相補性決定領域(CDR)を有するであろう。大量に経済的に製造される本発明の免疫グロブリンは例えば種々の技術によるヒト患者におけるHSV媒介障害の処理において有用である。

HSVは全てのウイルスのうちで最もよく研究されているものであり、そしてHSVビリオン構造は約33種のタンパク質を含むことが示されている。これらのタンパク質、特に8種の表面構造タンパク質(例えばgB、gC、gD、gE、gG及びgI)に反応性のモノクローナル抗体に由来するCDRを利用してヒト化免疫グロブリンは本発明の好ましい特徴を示す(Spear, P.G., *The Herpesviruses*, 第3巻、頁315-356 (1984)(Roizman, B., 講)、Plenum Press, N.Y., N.Y.及びSpear, P.G., *Immunobiology of Viruses: The Basis for Serodiagnosis and Vaccines*, 頁425-446 (1985)(Neurath, A.R.編)、(Amsterdam: Elsevier)を参照のこと)。

ある観点において、本発明はHSVタンパク質の所望のエピトープに結合することのできる免疫グロブリン、例えばHSVのgB及びgD等タンパク質に反応性のモノクローナル抗体に由来する重鎖及び/又は軽鎖をコードする組換えDNAセグメントに関連する。このような領域をコードするDNAセグメントは一般に適当なヒト化フレームワーク領域をコードするDNAセグメントに連結されているであろう。モノクローナル抗体Fd79及びFd138-80に由来する重鎖及び軽鎖超可変領域(ヒトフレームワーク領域を伴う)を含んで成るポリペプチド鎖をコードする典型的なDNA配列を図14に示す。コドン密度及び重要なアミノ酸置換に基づき、以下に詳しく述べ3通り、その他

HSV感染細胞において50種以上のHSVポリペプチドが同定されており、それには少なくとも7種の主要細胞表面タンパク質が含まれる(Virology Fieldら編、第2版、Raven Press, N.Y., N.Y. (1990)のWhitley, R.の第65章及びBelzileanとSearsの第65章、を参照のこと)。これらの諸タンパク質の特異的な生物学的機能はあまりよく解明されていないが、しかしながらgB及びgDは細胞融合活性に関係することが示されている(W.Caiら、J. Virol. 52, 2596 (1988)及びFullerとSpear, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81, 5454 (1987))。gB及びgDは種特異的及び種共通の抗原決定基の両者を発現する。OakesとLaussはgB及びgDに対するモノクローナル抗体が、三叉神経炎におけるHSV-1の複製を抑制することを実証した(OakesとLauss, J.Virol. 51, 856 (1984))。Dixらは抗-gC及びgD抗体が急性ウイルス誘発性神経障害からマウスを守ることを示した(Dixら、Infect. Immun. 34, 192 (1981))。Whitleyとその仲間はHSV-1に対するネズミモノクローナル抗体のパネルを作製し、そしていくつかの抗体がウイルスによる目の感染による脳炎及び死からマウスを守ることを示している(Kogaら、Virology 151, 385 (1986); Metcalfら、Curr.Eyes Res. 5, 173 (1987)及びMetcalfらIntervirology 29, 39 (1989)を参照のこと)。クローンFd79(抗-gB)はたとえ免疫化が感染して48時間まで遅れても脳炎を防いだ。Fd79及びFd138-80(抗-gD)は上皮角膜炎の重症度を有意に引き下げ、そして異形交配マウスモデル中の持続性ウイルス感染の頻度を低めた。

本発明に従い、HSV関連エピトープと、このウイルス上に直接的に又は感染化細胞に特異的に反応性なヒト化免疫グロブリンを提供する。少なくとも $10^4 M^{-1}$ 、そして好ましくは $10^5 M^{-1}$ ~ $10^6 M^{-1}$ 又はそれより強力なHSV特異的抗体に対する結合親和力を有すること

のDNA配列がこれらの配列に容易にとて代わることができる。

本発明の任意のヒト化免疫グロブリンはその他の抗体、特に種々のHSV抗原に反応性のヒト化抗体と組合せて利用することもできる。例えば、ヒト化免疫グロブリンの混合物が反応しうる適当なHSV抗原にはgC、gE、gP、gG及びgIが含まれる(Bector, J.ら、Infect. Immun. 38, 168 (1982)及びFullerら、J.Virol. 53, 3435 (1989)を参照のこと)。

これらの抗体はアシロクロビル又はその他の抗ウイルス剤と一緒に付与される独立投与型組成物としても利用される。典型的にはこの試験にはイドクスクリジン又はトリフルオロチミジンが含まれるが、しかしながらHSV認定についての業界の皆業者によく知られている真大な数の添加剤(例えばビグラビシ)も利用されうる(Corey, L.前掲を参照のこと)。本発明の好ましい薬品剤はHSVにより感染された細胞を殺す免疫毒性の対象の免疫グロブリンの利用を含んで成る。

これらのヒト化抗体は試験管内における広範囲にわたる種々な用途に有用性が見い出せうる。例えば、これらの抗体はHSV抗原の検査、特定のHSV感染化細胞又はウイルスの断片の単離、ワクチンの調製等に利用できる。

実験

重鎖及び軽鎖cDNAのクローニング

重鎖及び軽鎖可変ドメイン遺伝子に関するcDNAをアンカー化ポリメラーゼ連鎖反応により(E.H.Labら、Science 243, 217 (1989))、定常領域にハイブリダイズされ、且つ、BamH I部位を含む3'プライマーと、4Gテールにハイブリダイズされ、且つ、EcoRI部位を含む5'プライマーを用いてクローニングする(図6において手法を示す)。この方法は、可変ドメイン配列にアニールさせるように設計した混

特表平6-503963 (17)

合プライマーを用いるその他の方法 (J. W. Larrickら、*Bio/Technology* 1, 934 (1989) 及び Y. L. Chiangら、*BioTechnol.* 7, 360 (1989)) と比べて、真性可変ドメイン配列を有するクローンをもたらす。このPCR増幅化断片をシーケンシングのために EcoRI 及び HindIII により消化し、次いで pUC18ベクターの中にクローンした。Fd79に関しては、2つのガンマー-1特異性及び5つのカッパー特異性クローンをシーケンス化した。この2つのガンマー-1特異性クローンは配列において同一であった。この重鎮cDNA断片は19個のアミノ酸のシグナルペプチド、マウス重鎮サブグループⅡにおけるV領域、Dセグメント、及びゲノムJ。1配列と比較して4箇所の変異を有する J_μ 1セグメントをコードする。推定のアミノ酸配列を図14Aに示す。

5つのカッパー特異性クローンは2つのグループに属した。2つのクローンは同一であり、そして23番目の保存性アミノ酸システィンがチロシンにより置換され、おそらくは非生産性アレルを示すカッパー種をコードする。他の3つのクローンは20個のアミノ酸のシグナルペプチド配列、マウスカッパー鎖サブグループⅡにおけるV領域、及びゲノムJ。2配列と比較して1箇所の変異を有する J_μ 2セグメントをコードする同一の配列を有する (図14B)。重鎮及びカッパー鎖配列の有効性は以下に述べるキメラ抗体の作製及び発現により確認した。

Fd138-80の重鎮及びカッパー鎖は似たようにクローンした。重鎮及びカッパー鎖の3つのクローンをシーケンス化した。全ての3つの重鎮クローンは19個のアミノ酸のシグナルペプチド配列、マウス重鎮サブグループⅡにおけるV領域、Dセグメント及び J_μ 3セグメントをコードする同一の配列を有する (図14C)。この3つのカッパークローンは配列においても同一であった。重鎮フラグメントは20個のアミノ酸のシグナルペプチド、マウスカッパー鎖サブグル

ープVにおけるV領域遺伝子、及び J_μ 5セグメントをコードする (図14D)。コード配列において両方の鎖は異常を示さなかった: それらの有効性を次にキメラ抗体の作製及び発現により確認した。キメラ抗体の作製及び発現

キメラ抗体遺伝子の作製及び発現のために2種類のプラスミドベクターを調製した。プラスミド pVg1 (図15A) はヒトサイトメガロウイルスIE1プロモーター及びエンハンサー (H. Boshartら、*Cell* 41, 521 (1985))、前方のイントロンの一部を含むヒトゲノム C_{tr} 1セグメント、並びに選別ためのヒグロマイシン遺伝子 (Blocklingerら、*Mol. Cell. Biol.* 4, 2929 (1984)) を含む。プラスミド pV1 (図15B) は pVg1 と類似するが、しかしながらヒトゲノム C_{tr} 5セグメント及び J_μ 1遺伝子を含む。Fd79及びFd138-80の重及び軽鎖可変領域の該抗体をポリメラーゼ連鎖反応によりcDNAから調製した。5'プライマーは ATGコドンにおいて出発するV領域にハイブリダイズしており、そして 3'プライマーは J領域の最後の15個のヌクレオチドとハイブリダイズしており、そしてスプライスドナーシグナル及び XbaI部位を含む (C. Queenら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 10029 (1989) を参照のこと)。改質V領域を調達のプラスミドベクターの CH9プロモーターと定常領域の部分イントロンとの間の XbaI部位の中にクローンした。

キメラ抗体の発現のため、重鎮及びカッパー鎖プラスミドをエレクトロポレーションによって Sp2/0マウスエローマ細胞にトランシスフェクトし、そして sp1発現について細胞を選別した。最大量の完全抗体を分離するクローンを ELISAにより検定した。精製したキメラFd79及びFd138-80抗体は、フローサイトメトリーにより、HSV-1感染化 vero細胞に結合することが示された。ウイルス中和アッセイは、キメラ抗体がネズミ抗体の中和活性を保持しているこ

とを示した (データーは示さず、しかしながら以下のヒト抗体の結果の結果を参照のこと)。

ヒト化抗体のコンピューターモデル化

ヒト化抗体において高結合親和力を維持せしめるため、Queenらの一般手順に従った (C. Queenら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 10029 (1989))。ヒト抗体が元のネズミ抗体とより相間性であるに従い、ネズミ CDRをヒトフレームワークに組合せることによる、親和力を低めうる、CDRへの組みの導入の傾向が下がるであろう。通常、同一のヒト抗体に由来する重鎮及び軽鎮をフレームワーク配列を提供するために選び、これによりこの2つの鎖を集成するうえでの非適合性の可能性は低まる。NBRPタンパク質配列データーベースに対する配列相間性探索 (MicroGenie Sequence Analysis Software (Beckman) により実施) に基づき、抗体 Paa 及び Fd79のヒト化のためのフレームワーク配列を担うために選んだ。

Fd79可変領域のモデルを作製するためにコンピュータープログラム ERCA (Levitt, J. Mol. Biol. 168, 595 (1983)) を利用した。ネズミFd79の精密なモデルの調査は、CDR残基に直接に接触するのに十分に近いフレームワーク中の2箇のアミノ酸残基を示した (表4)。軽鎮のNBRP位置49における Lys は、軽鎮のCDR2における3つのアミノ酸 (L50の Try, L53の Asn, L55の Glu) 及び重鎮におけるCDR3の2箇のアミノ酸 (H99の Asp, H100の Tyr) に接している。重鎮の位置93における Leu は重鎮のCDR2における2箇のアミノ酸 (H35の Ser, H37の Val) 及び重鎮のCDR3におけるアミノ酸 (H100の Phe) との相互作用を示す。それ故、L49の Lys 及び H93の Leu はヒト化Fd79の作製において維持し、なぜならそれらのヒト Paaフレームワーク残基による置換は CDRに歪みを導入しがちであろうからである。更に、Paaフレームワークにおける7箇の他の残

基 (軽鎮のうちの5箇及び重鎮における2箇) を共通ヒト残基で置換し (ネズミFd79配列と6通りの選択において同一)、その理由はそれらは、他のヒト抗体においてまれであるからである。フレームワークにおける普通でないアミノ酸の削除は免疫原性を更に低める。このネズミFd79配列及び調達のヒト化配列を図14A, Bに示す。Paaフレームワーク中の置換された残基に下線を付してある。

表 4

軽可変領域中の残基と接しているフレームワーク配列中の残基

残基番号 ¹	アミノ酸	接する CDR残基 ²
Fd79		
L49	Lys	L50Y, L53N, L55E, H99D, H100Y
H93	Leu	H35S, H37V, H100C
Fd138-80		
L36	Lys	L34V, L89Q
H27	Tyr	H32E, H34I
H30	Tyr	H32E, H53R
H48	Phe	H63F
H66	Lys	H63P
H67	Ala	H63F

1. アミノ酸残基は Kabat系に従って番号付けした (B. A. Kabatら、*Sequences of Proteins of Immunological Interest*, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1987)) : 第1文字 (H又は L) は重鎮又は軽鎮を意味する。続く番号は残基番号である。最後の文字はアミノ酸の1文字コードである。

2. 超可変領域は Kabatに従って決定した:

軽鎮CDR1: 残基24-34; CDR2: 50-56; CDR3: 89-97

特表平6-503963 (18)

重複CDR1: 31-35 ; CDR2: 50-65 ; CDR3: 95-102

同様にして、Fd138-80のネズミ重複及び軽鎖配列をNBRFタンパク質配列データベースに対する配列相間性深常にかけた。ヒト化Fd138-80のためのフレームワーク配列を担うのにヒト抗体Euの配列を選んだ。Fd138-80のコンピューター作成モデルの調査は、このフレームワーク中の6個のアミノ酸残基がCDR残基との重要な接触のために十分に近くにあることを示した。これらの残基及びその接觸対応物を表1に記載する；これらのネズミ残基はヒト化Fd138-80の構造の中で維持させた。2個の他の残基(L87のPhe及びH37のMet)はL98 Pheとの有する接觸性を示し、これらはCDR3のすぐ隣にあり、従ってこれら2個のマウス残基も残した。80フレームワーク中の8個のアミノ酸(総計のうちの2個及び重複のうちの6個)をネズミ残基で置換し(これらもヒト共通残基を構成する)、なぜならそれはその他のヒト抗体においてまれであるからである。ネズミFd138-80配列及び対応のヒト化配列を図14Cに示す。80フレームワーク中の置換された残基に下線を付した。

ヒト化抗体のための遺伝子の作成のため、一般にマウス配列において見い出せるコドンを利用して、シグナルペプチドを含むヒト化重及び軽鎖のタンパク質配列をコードするスクレオチド配列を選択した。複数の組合コドンを変えて、制限部位を作る又は希望されないものを除去した。このスクレオチド配列はキメラ遺伝子において利用されているものと同じスプライスドナーシグナル及び各鎖でのXba I部位も含んでいた。各遺伝子を4つの重複合成オリゴスクレオチドから作成した。各可変ドメイン遺伝子のため、交互鎖上の2対の重複オリゴスクレオチドを合成し、これは全コード配列並びにシグナルペプチド及びスプライスドナーシグナルを含んでいた。このオリゴスクレオチドはアプライドバイオシステム380B DNA合成装置

で合成した。各オリゴは約110-140の塩基の長さであり、その15塩基は重複していた。二本鎖DNA断片をクレノウボリメラーゼにより合成し、制限酵素で消化し、pUC18ベクターにリゲートし、次いでシーケンス化した。適切な配列を有するこの2種の断片を次にpSV1-dbfR又はpVK発現ベクターのXba I部位にリゲートした。

合成遺伝子をpSV1及びpVK発現ベクターの中にクローニングした。作製した各ヒト化抗体に関して、重複及び軽鎖プラスミドをエレクトロポレーションによってSp2/0マウスマイローマ細胞にトランスフェクトし、そしてpET発現について細胞を選別した。ELISAによって培養上清液中のヒト抗体生産をアッセイすることによりクローニングをスクリーンし、そして最も生産クローニングから抗体を精製した。抗体は組織培養上清液をスタフィロコッカスプロテインAーセファローズCL-4B(ファルマシア)のカラムに通すことによって精製した。結合抗体を0.2Mのグリシン-HCl、pH 3.0により掩蔽させ、次いで1Mのトリス、pH 8.0で中和した。この緩衝液をPDI0カラム(ファルマシア)に通してPBSに交換した。

ヒト化抗体の性質

ヒト化Fd79及びFd138-80抗体をネズミ及びキメラ抗体と比較して特異化した。両方のヒト化抗体は、RSV-1により感染されたVero細胞に、フルオロサイトメトリー分析においてキメラ抗体と同様に結合し(図16)、これらが対応のウイルス抗原を認識することが示唆された。この結合活性をより定量的に評価するため、放射性ヨウ素化ネズミ抗体をウイルス感染細胞に結合させ、そしてスキャナード分析を実施した。

ヒト化抗体の親和力をヨウ素化抗体との競合によって決定した。RSV-1により感染された細胞をgB及びgD抗原の起源として利用した。競合抗体(マウス又はヒト化)の量を増やしながら1.5agの放

射性ヨウ素化トレーサーマウス抗体(2 μCi/μg)に加え、そして0.2mlの結合用緩衝液(PBS+2%のFCS+0.1%のアサイド)の中で 4×10^5 の感染化Vero細胞と4で1時間インキュベートした。細胞を洗い、次いでペレット化し、そしてその放射活性を測定した。結合親和力を計算した。結合親和力は

Berzofskyの方法に従って計算した(J.A.Berzofsky and I.J.BerwangerのFundamental Immunology (W.E.Paul編)、Raven Press (New York), 595 (1984))。

この測定値が示すには、ヒト抗体において結合親和力の有意な損失はなかった(表5)。詳しくは、ヒト化Fd79における親和力はネズミFd79と比べて1/2に下った($5.3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ 対 $1.1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ のK₁)、ヒト化Fd138-80の親和力はネズミ抗体のそれに匹敵した($4.8 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ 対 $5.2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ のK₁)。

表 5

ネズミ及びヒト化抗体の結合親和力

	マウス K ₁ (M ⁻¹)	ヒト化 K ₁ (M ⁻¹)
Fd79 (抗-gB)	1.1×10^8	5.3×10^7
Fd138-80 (抗-gD)	5.2×10^7	4.8×10^7

ネズミFd79及びFd138-80は補体なしで試験管内でRSV-1を中和することが示されており(J.Kogaら、Virology 151, 385 (1986))、従ってヒト化抗体の中和活性をこれらのマウス抗体と比較した。

Vero細胞への接種の前に、同様のネズミとヒト化抗体の希釈系列をウイルスとインキュベートした。4日後、細胞を中性レッドで染めてブラックを識別化させた。これらのブラック削減アッセイに由来する結果は、この両方のヒト化Fd79及びFd138-80がそのネズミ対応

物と同等にウイルスを中和せしめることを示唆した(図17A及びB)。ヒト化及びネズミのFd79の両者は 10nM ($1.5 \mu\text{g}/\text{ml}$)の抗体濃度でブラックの90%を削減させた。同様に、ヒト化及びネズミFd138-80は同じレベルにて90%のブラックを削減を起こさせることができる。

これらの抗体は、組織培養物に分散されたウイルスから細胞を守るその能力についても調べられた。Vero細胞にウイルスを $0.1 \text{ pfu}/\text{細胞}$ で接種させ、次いで $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の抗体を加える前に37℃で2時間培養させた。4日後、感染化細胞上のウイルス抗原の検定のために細胞を抗-gB抗体で染めた。結果が示すには、ネズミ及びヒト化Fd79の両者は $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ で培養細胞を感染から守った(図18A)。しかしながら、ネズミもヒト化Fd138-80も、接種前のそのウイルスを中和する能力にもかかわらず、ウイルスの分散に対して細胞を守ることはできなかった(図18B)。gB及びgDの両者は細胞融合及びウイルス感染に関連すると考えられている(H.Caiら、J.Viro. 52, 2596 (1988) 及びJ.O.FullerとP.G.Spear, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84, 5454 (1987))。しかしながら、FdはgBの感染及び細胞融合能の両方をブロックすることが可能であり、他方Fd138-80はgDの感染能のみをブロックするため、ウイルスは細胞から細胞へと移ることができ続ける。

結合、中和及び防融合結果の全ては、ヒト化Fd79及びFd138-80抗体がネズミモノクローナル抗体の結合活性及び生物学的性質を保持していることを示唆する。とりわけ RSVのgB及びgDに対する特異性を有するヒト化抗体の能力は、ウイルス障害の処置におけるヒト化抗体の生体内能力及び免疫原性の研究の競合を提供する。gB及びgDの共通のタイプのエピトープのFd79及びFd138-80による認識(J.Kogaら、Virology 151, 385 (1986))はヘルペス单纯ウイルス2型及び1型に対して有効な治療を広げる。

特表平6-503963 (19)

生体内におけるヘルペス感染症に対するヒト化抗体の効果を調べるために、致死量の HSV-2 の接種の前後でマウスにヒト化抗体を注射し、そして死亡率をモニターした。動物のグループを 0.9, 0.3 又は 0.1mg のヒト化 Fd79 又は Fd138-80 のそれそれにより、ウイルス接種の 24hr 前又は 24hr 後にて腹腔内処置した。10匹のマウスのグループに致死量の HSV-2 を腹腔内に付与した。マウスを 3 週間にわたりモニターした。死亡率を以下の表に示す。

この結果が示すには、マウスの HSV-2 感染に対して有意な効果がヒト化 Fd79 及びヒト化 Fd138-80 により獲得された。

表 6

HSV-2 を鼻口内接種させたマウスの死亡率に及ぼす HSV 抗体前処置 (-24h) の効果

処置	数	パーセント	P-値
コントロール	13/15	87	---
偽薬	13/15	87	NS
ネズミ Fd138			
0.9mg	3/10	30	<0.001
0.3mg	5/10	50	0.01
0.1mg	5/10	50	0.08
ヒト化 Fd138			
0.9mg	1/10	10	<0.001
0.3mg	8/10	80	NS
0.1mg	7/10	70	NS
ネズミ Fd79			
0.9mg	0/10	0	<0.001
0.3mg	2/10	20	<0.01
0.1mg	4/10	40	<0.05
ヒト化 Fd79			
0.9mg	1/10	10	<0.01
0.3mg	3/10	30	0.08
0.1mg	5/10	50	0.08

表 7

HSV-2 を鼻口内接種させたマウスの死亡率に及ぼす HSV 抗体後処置 (+24h) の効果

処理	数	パーセント	P-値
コントロール	12/15	80	---
偽薬	15/15	100	NS
ネズミ Fd138			
0.9mg	2/10	20	<0.001
0.3mg	4/10	40	0.001
0.1mg	5/10	50	<0.01
ヒト化 Fd138			
0.9mg	3/10	30	<0.001
0.3mg	3/10	30	<0.001
0.1mg	9/10	90	NS
ネズミ Fd79			
0.9mg	5/10	50	<0.01
0.3mg	3/10	30	<0.001
0.1mg	6/10	60	<0.05
ヒト化 Fd79			
0.9mg	3/10	30	<0.001
0.3mg	3/10	30	<0.001
0.1mg	9/10	90	NS

治療における 2 種以上のヒト化抗体の組合せの利用は抗体耐性株の発生を低めるために重要である。ヒト化抗体と別の抗ウイルス剤、例えばアシクロビルとの組合せ治療は、化学治療剤単独では有効でないときに障害に打ち勝つ更なる機会を提供する。 Fd79 及び Fd138-80

はネズミの目のモデルにおけるウイルスの持続性の率を下げるため (J.P. Metcalfら, *Cur. Eye Res.* 6, 173 (1987))、ヒト化抗体は典型的にはその他の抗ウイルス剤と一緒にになって、再発性生殖器感染症の状況 (その箇所は従来抗ウイルス剤は有効でないとされていた (L. Coreyら, *N. Engl. J. Med.* 306, 1313 (1982)) を抑えることができる。ヒト定常ドメインの一体化はエフェクター機能、例えば抗体依存性細胞毒性を高めることもでき、これはヒト患者におけるより多大な治療的効果をもたらす。

例 3

CD33 抗原に対するヒト化免疫グロブリン

米国において年間約 10,000~15,000 の新しい骨髓性 (非リンパ球性又は顆粒球性とも呼ばれている) 白血病のケースがある (Cancer Facts & Figures, American Cancer Society, 1987)。骨髓白血病には 2 つの主たる形態: 急性骨髓性白血病 (AML) 及び慢性骨髓性白血病 (CML) がある。化学治療による処置にもかかわらず、 AML に思う患者の長期生存は 10~20% 以下であり (Clarksonら, *CRC Critical Review in Oncology/Hematology* 4, 221 (1986))、そして CML 並びに闊達の障害、例えば慢性骨髓性単球白血病 (CMML)、慢性単球性白血病 (CMOL) 及び骨髓形成異常症 (MDS) に思う者の生存率は更に低い。

CD33 に結合するその他の抗体は M195 である (Takimotoら, *Lancet* 3, 339 (1989) 及び Scheinbergら *Lancet* 3, 440 (1989))。M195 の広範囲にわたる様々な細胞及び組織との反応性を試験した。正常な細胞のうちで、 M195 は一定の単球及び骨髓先祖細胞にのみ結合することが報告されている。その報告は、これがその他の造血細胞又は非造血細胞に結合しないことも報告している。 M195 は AML のほとんどのケース及び骨髓芽球期における CML の全てのケースの細胞に

特表平6-503963 (20)

結合する。

AMLにおけるM195の第1段階臨床試験が実施されている(Scheinbergら、*Proc. ASCO* 9, 207 (1990))。ヨウ素 131により放射ラベル化されたM195は血液及び骨髓の両方における白血病細胞を迅速に、且つ、特異的に標的的に見い出されている。

本発明により、CD33関連エピトープに特異的に反応するヒト化免疫グロブリンが提供された。少なくとも約 $10^9 M^{-1}$ 、そして好みくは $10^8 M^{-1}$ ~ $10^{10} M^{-1}$ 又はそれより強いCD33への結合親和力を有するこれらの免疫グロブリンは白血病細胞を破壊することができる。既ヒト化免疫グロブリンはヒトフレームワークを有しており、そして典型的にはマウス免疫グロブリン、詳しく述べてはCD33抗原に反応性な免疫グロブリンに由来する又は複数の相補性決定領域(CDR)を有するであろう。好みの類型においては、L又は複数のCDRはM195抗体に由来するであろう。M195は充血性白血病細胞と結合しなく、従って治療において利用されるM195がそれらの細胞に相互作用してそれを破壊することが量少限であることが重要であり、これは全ての白血病細胞の発生にとどめることである。従って、大量に経済的に製造できる本発明のCD33特異性免疫グロブリンは例えば様々な技術によりヒト患者における骨髄細胞膜介障害の処置において利用されうる。

ある観点において、本発明はCD33抗原の所望のエピトープに結合することのできる免疫グロブリン、例えばモノクローナル抗体M195、L183、L182又はMY9に由来する重鎖及び/又は軽鎖をコードする組換えDNAセグメントに関する。このような領域をコードするDNAセグメントは一般に適切なヒト化フレームワーク領域をコードするDNAセグメントに連結されているであろう。発明に基づいてモノクローナル抗体M195の重鎖及び軽鎖のCDRに由来するポリペプチド鎖をコード

する典型的なDNA配列を図19に含ませた。コドン位置及び重要でないアミノ酸置換に基づき、以下の詳しく述べる通り、その他のDNA配列がこれらの配列に容易にとて代わることができる。

本発明の抗体は血液学悪性疾患においてそれぞれ典型的に利用されるであろう。例えば、処置に適する典型的な障害症状にはAML、CML、CMML、CMHOL及びMDSが含まれる(一般に、Hoffbrand & Pettit, *Essential Haematology*, Blackwell Scientific Publications, Oxford (1980)を参照のこと)。この抗体は骨髄移植前の骨髄切除外のためにも利用されうる。

本発明の任意のヒト化免疫グロブリンはその他の抗体、特に種々の骨髄抗原に反応性のヒト化抗体と組合せて利用することもできる。例えば、ヒト化免疫グロブリンの混合物が反応しうる適切な抗体には、CD13、CD14、CD15、CD16及びCD34が含まれる(Leukocyte Typing III、前掲、頁 576-732を参照のこと)。

これらの抗体は化学治療剤と一緒に付与される独立投与型組成物としても利用されうる。典型的には、この試験にはシトシンアラビノシド及びグアノルビンが含まれうるが、しかしながら白血病処置についての業界の当業者によく知られている高大な数の添加剤(例えば6-チオガラニン)も利用されうる(Hoffbrand & Pettit、前掲)。本発明の好みの薬品剤は白血病細胞を殺す免疫毒性の対象の免疫グロブリンの利用を含んで成る。

本発明のヒト化抗体は試験管内における広範囲にわたる様々な用途に有用性が見い出せうる。例えば、これらの抗体はCD33抗原の検査、特定の骨髄細胞の単離等に利用できる。

この実験はM195抗体に固執したが、CD33抗原に対して高い結合親和力を有するヒト化抗体の製造は、L183、L182、MY9又はその他のCD33エピトープに結合するモノクローナル抗体由来のCDRを用いる

ことも考えられる。

実験

重鎖及び軽鎖cDNAのクローニング

重鎖及び軽鎖可変ドメイン遺伝子に関するcDNAをアンカーハーフメラーゼ連鎖反応により(E. B. Labら、*Science* 243, 217 (1989))、定常領域にハイブリダイズされ、且つ、*Hind* III部位を含む3'プライマーと、*EC* III部位にハイブリダイズされ、且つ、*Eco* RI部位を含む5'プライマーを用いてクローニング(図6において手法を示す)。このPCR増幅化断片をシーケンシングのために*Eco* RI及び*Hind* IIIにより消化し、次いで pBC19ベクターの中にクローニングした。M195に関しては、2つのガンマ-2a特異性及び2つのカッパー特異性クローニングをシーケンス化した。この2つのガンマ-2aクローニング及び2つのカッパークローニングはそれぞれ配列において同一である。cDNA可変ドメイン配列及びその推定アミノ酸配列を図19に示す。

モノクローナル抗体の作製及び発現

モノクローナル抗体遺伝子の作製及び発現のために2種類のプラスミドベクターを調整した。プラスミドpVgl-dfr(図20A)はヒトサイトメガロウイルスIE1プロモーター及びエンハンサー(H. Boshartら、*Cell* 41, 521 (1985))、前方のイントロンの一部を含むヒトゲノムC α T 1セグメント、並びに選別のためのジヒドロフォレートリダクターゼ(dfr)遺伝子(Simonsenら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 2495 (1983))を含む。プラスミドpVK(図20B)はpVgl-dfrと類似するが、しかしながらヒトゲノムC α セグメント及びgpt遺伝子を含む。M195の重鎖及び軽鎖可変領域の誘導体をポリメラーゼ連鎖反応によりcDNAから調整した。5'プライマーはATGコドンにおいて出発するV領域にハイブリダイズしており、そして Iba I部位を含み；3'プライマーはJ領域の最後の15個のスクレオチドとハ

イブリダイズしており、そしてスプライスドナーシグナル及び Iba I部位を含む(C. Queenら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 10029 (1989)を参照のこと)。改質V領域を間違のプラミドベクターのCHVプロモーターと定常領域の部分イントロンとの間の Iba I部位の中にクローニングした。

キメラ抗体の発現のため、重鎖及びカッパー鎖プラスミドをエレクトロボレーションによってSp 2/0マウスミエローマ細胞にトランسفクトし、そしてgpt発現について細胞を選別した。最大量の完全抗体を分泌するクローニングをELISAにより検定した。精製したキメラM195抗体は、フローサイトメトリーにより、CD33抗原を発現するU937細胞に結合することが示された(図21)。

ヒト化抗体のコンピューターモデル化

ヒト化抗体において高結合親和力を維持せしめるため、Queenらの一般手順に従った(C. Queenら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 10029 (1989))。ヒト抗体が元のネズミ抗体とより相間性であるに従い、ネズミCDRをヒトフレームワークに組合せることによる、親和力を低めうる、CDRへの型の導入の傾向が下がるであろう。通常、同一のヒト抗体に由来する重鎖及び軽鎖をフレームワーク配列を提供するために選び、これによりこの2本の鎖を集成するうえでの非適合性の可能性は低まる。EBP8クンバク質配列データベースに対する配列相間性検索(Hicro Gene Sequence Analysis Software (Beckman)により実施)に基づき、抗体Baを、M195のヒト化のためのフレームワーク配列を組うために選んだ。

M195可変領域のモデルを作製するためにコンピュータープログラムEMCAD (H. Levitt, *J. Mol. Biol.* 189, 595 (1983))を用いた。このモデルは、CDRに十分に密接していそれらと有効な相互作用するM195フレームワークにおけるアミノ酸を決定するために用いた

(以下のカテゴリー4)。ヒト化糖及び重鎮H195可変領域を設計するには、次の4つのカテゴリーのうちの1つ又は複数に属しない限り、各位置においてEu抗体と同一のアミノ酸を選択した：

(1) その位置が CDRに属した。

(2) その位置では、Euアミノ酸がヒト抗体に含まれてあり、一方、その位置では、H195アミノ酸がヒト抗体に典型的であった。

(3) その位置が CDRのすぐ近くであった。

(4) 上記したモデルが、そのアミノ酸が抗原結合性領域(CDR)に物理的に近いことを示唆した。

カテゴリー(2)において、「まれ」とは、Euの糖及び重鎮と同一のサブグループにおいてヒト配列の約20%以下で見い出せるアミノ酸を含むものと解釈され(Ishiiら、前掲に定義)、そして「典型的」とは、そのサブグループにおいてヒト配列の約25%以上、しかしながら一般には50%以上で見い出せるアミノ酸を含むものと解釈される。これらのカテゴリーにおける位置に関して、マウスH195抗体に由来するアミノ酸を用いた：各カテゴリーにおけるアミノ酸を表8に示す。いくつかのアミノ酸は複数のカテゴリーに属する。ヒト化H195の糖及び重鎮可変ドメインの最終配列を図22に示し、Eu配列と比較する。

表 8

カテゴリー	糖	重鎮
1	24-38, 54-60, 93-101	31-35, 50-66, 99-105
2	10, 52, 67, 110	93, 95, 98, 106, 107, 108, 110
3	--	30, 67, 98, 106
4	40, 52, 74	27, 30, 48, 68, 98

ヒト化抗体のための遺伝子の作製のため、一般にマウス配列における

いて見い出せるコドンを利用して、マウスのH195鎖中と同一のシグナルペプチド(図19)を含むヒト化糖及び重鎮のタンパク質配列をコードするスクレオチド配列を選別した。複数の縮合コドンを変えて、前限部位を作る又は所望されないものを除去した。このスクレオチド配列はキメラ遺伝子において利用されているものと同じスプライスドナーシグナル及び各端のKbaI部位も含んでいた。各遺伝子を4つの重複合成オリゴスクレオチドから作製した。各可変ドメイン遺伝子のため、交互鎖上の2対の重複オリゴスクレオチドを合成し、これは全コード配列並びにシグナルペプチド及びスプライスドナーシグナル(図23)を含んでいた。このオリゴスクレオチドはアブライドバイオシステム3800 DNA合成装置で合成した。各オリゴは約110-140'の塩基の長さであり、その約15塩基は重複していた。各対のオリゴスクレオチドから二本鎖DNA断片をクレノウボリメラーゼにより合成し、制限酵素で消化し、pUC18ベクターにリガートし、次いでシーケンス化した。対応の適切な半配列を有するこの2種の断片を次にpVgel-1dbfr又はpVII免疫ベクターのKbaI部位に、完全な重複及び重鎮遺伝子を精製せしめる正しい方向でリゲートした。反応は当業界によく知られる条件のもとで行った(Hanisiotら、前掲)。

重鎮及び糖鎖プラスミドをエレクトロポレーションによって3p2/0マウスミエローマ細胞にトランسفェクトし、そしてgp7免疫について細胞を選別した。ELISAによって培養上清液中のヒト抗体生産をアッセイすることによりクローリングをスクリーンし、そして最良生産クローリングから抗体を精製した。抗体は組織培養上清液をスクリーニングコッカスプロテインA-セラファローズCL-48(ファルマシア)のカラムに通すことによって精製した。結合抗体を0.2Mのグリシン-HCl、pH 3.0により溶解させ、次いで1Mのトリス、pH 8.0で

中和した。この緩衝液をPD10カラム(ファルマシア)に通して PBSに交換した。

ヒト化抗体の性質

ヒト化H195抗体をネズミ及びキメラ抗体と比較して特異化した。該ヒト化抗体は、U937細胞に、フルオロサイトメリー分析においてキメラ抗体と同様に結合し(図21)、これが同じCD33抗原を認識することが示唆された。

ヒト化抗体の親和力は放射性ヨウ素化マウスH195抗体との競合によって決定した(図24)。結合親和力は Berzofskyの方法に従って計算した(J.A. BerzofskyとI.J. Berkovekの、*Fundamental Immunology* (W.B. Saunders編), Raven Press (New York), 595 (1984))。マウスH195は公開の値(Taniguchiら、前掲)に匹敵する親和力を有し、そしてヒト化H195抗体は実験誤差の範囲内でマウスH195と同程度の親和力を有していた。

ヒト化H195は、ヒトエフェクター細胞及びヒトCD33-発現細胞を用いるとき、抗体依存性細胞毒性細胞毒率を媒介するのに有用である。これは例えばJeonghaeら、*Cancer Research* 50, 1495 (1990)により報告されているその他のヒト化抗体と類似している。

残念ながら、非ヒトモノクローナル抗体、例えばH195の利用はヒトの处置、特に繰り返し治療法において一定の欠点を有する。

例 4

CHV抗原に対するヒト化免疫グロブリン

サイトメガロウイルスは免疫無能状態の個体、特に骨髄移植受容者、器官移植受容者及びAIDS患者の主たる病因となる(一般に、Fieldら編、*Virology* 第2版、Raven Press, New York 買1981-2010 (1990)を参照のこと)。骨髄移植受容者の約15%はCHV感染を発症し、85%の死亡率にある(Heyers, *Rev. Inf. Dis.* 11 (付7)。

1989)。AIDS患者の約10%は度重なるCHV障害、及び特異的な後天性CHVを、高い罹病率及び死亡率を伴って発症し、新生児の1%に影響が及ぼされている(Fieldら前掲)。

東洋ガンシクロビルはCHV感染症の一症状、特に原発性肝炎及び腎臓炎に対して有効であるが、しかしながらCHV肺炎に対してはあまり有効でなく、そしてかなりの毒性を有している。アルシルヒト免疫グロブリン調製物の利用は骨髄移植患者におけるCHVの予防についていくつかの利点効果が示されており(Bayer前掲)、そして高用量の免疫グロブリンとガンシクロビルの組合せはCHV肺炎に対して有効であることが報告されている(Beaumelら、*Trans. Proc. XIX (付7)* 192 (1987))。しかしながら、市販の免疫グロブリンの確実的な有効性、様々な細胞能力及び高い価値は重大な問題を残している。従って、CHVに対して有効な新規の薬剤の強い要望がある。

CHVはウイルスのヘルペスウイルス科の構成員であり、従って大きな二本鎖DNAコア、タンパク質カスビド、及び表面にウイルス糖タンパク質を有する外部糖質エンベロープを有している。少なくとも8種類のタンパク質がCHVのエンベロープ上で検出されており(Brittら、*J. Virol.* 52, 3309 (1988))、そしてCHVのDNA配列に基づいて他の存在していることが確定されている(Cheeら、*Nature* 311, 744 (1990))。2種類の特に有意義なCHV糖タンパク質、即ち、gp130/55又はgp55-116とも呼ばれる)及びgB(g86とも呼ばれている)に対するネズミモノクローナル抗体が製造されており(Pasununnenら、*Virology* 183, 308 (1988)及びBrittら、前掲)、そしてウイルスの感染性を中和することが示されている。既に対する3種類のその他の中和抗体がCHV5、CHV109及びCHV115と命名されている。CHVに対するヒトモノクローナル抗体も製造されている。

特表平6-503963 (22)

(Bhrichら、*Hybridoma* 5, 151 (1987))。

動物モデルにおいて、ネズミモノクローナル抗体がヘルペスウイルス科の構成員を含む様々なウイルスにより生ずる感染症の処置において有効であることが示されている（例えばMetcalfら、*Interviro* 29, 39 (1988) を参照のこと）。従って、かかる抗体は CMV感染症の処置において有用であろう。概念ながら、非ヒトモノクローナル抗体、例えばCHV5及びCHV115は以下に説明する通り、ヒトの処置、特に繰り返し治療法において一定の欠点を有している。

従って、ヒトにおいて実質的に非免疫原性であり、しかも治療型剤及びその他の用途にとって適切な状態において簡単に、且つ、経済的に製造される CMV抗原に対して特異的なヒト化免疫グロブリンの改良形態が要望されている。本発明はこれら及びその他の要望を満足せしめる。

本発明に従い、CMV及びCMV感染化細胞に特異的に反応性なヒト化免疫グロブリンを提供する。少なくとも約 $10^7 M^{-1}$ 、そして好ましくは $10^8 M^{-1} \sim 10^{10} M^{-1}$ 又はそれより強力な CMV特異的抗原に対する結合親和力を有するこれらの免疫グロブリンは例えば細胞のCMV感染をブロックすることができる。該ヒト化免疫グロブリンはヒトフレームワークを有しており、そして典型的にはマウス免疫グロブリン、詳しくは CMV抗原に反応性な免疫グロブリンに由来する 1 又は複数の相補性決定領域 (CDR) を有するであろう。好ましい態様において、1 又は複数の CDR は CHV5、又は CHV109、又は CHV115抗体に由来するであろう。大量に経済的に製造されうる本発明の免疫グロブリンは例えば種々の技術によるヒト患者における CMV媒介障害の処置において有用である。

ある観点において、本発明は CMV抗原の所望のエピトープに結合することのできる免疫グロブリン、例えばモノクローナル抗体CHV5

又はCHV115に由来する重鎖及び/又は軽鎖の CDRをコードする組換え DNAセグメントに因縁する。このような領域をコードする DNAセグメントは一般に適当なヒトフレームワーク領域をコードする DNAセグメントに連結されているであろう。モノクローナル抗体CHV5の重及び軽鎖の CDRを含んで成るポリペプチド鎖を発見に基づいてコードする典型的な DNA配列を図25に含ませている。コドン頻度及び重要でないアミノ酸置換に基づき、以下に述べる通り、その他のDNA配列がこれらの配列に容易にとって代わることができる。

断片が 1 又は複数の免疫グロブリン活性（例えば補体固定活性）を有する、一次抗体構造の一部のみを含んで成るポリペプチド断片を製造することができる。これらのポリペプチド断片は、当業界によく知られている方法による完全抗体のタンパク質分解によって、又は部位特異的突然変異説を利用して、ベクター pVX 及び pVg1-dfr (図26) における所望の位置に停止コドンを挿入する（例えばCH1 の後ろに挿入して Fab断片を作る、又はヒンジ領域の後ろに挿入して (Fab')_n 断片を作る）ことによって製造されうる。一本鎖抗体は VLと VH を DNAリンクで連結することによって製造されうる (Huston ら、前掲、及び Bird ら前掲を参照のこと)。

本発明の抗体は典型的には CMV関連障害の処置において各別に用途が見い出せる。例えば、処置に適する典型的な疾患症状には CMV筋炎、新生児 CMV感染症、CMV單核細胞症、並びに CMV関連結膜炎及び胃腸炎が含まれる。本発明の任當のヒト化免疫グロブリンはその他の抗体、特に様々な CMV抗原に反応性なヒト化抗体と組合せて利用することもできる。例えば、ヒト化免疫グロブリンの混合物が反応しうる適切な抗原には eB 及び eG タンパク質が含まれる。この抗体は化学治療剤と一緒に付与される独立性と型組成物としても利用されうる。典型的には、この試薬にはアシクロビル又はガンシ

クロビルが含まれうるが、しかしながら CMV処置についての当業者によく知られている莫大な数の他の試薬も含まれうる。本発明の好ましい更品製剤は CMV感染化細胞を殺す免疫毒性の対象の免疫グロブリンの利用を含んで成る。

本発明の CMV特異的ヒト化抗体は試験管内における広範囲にわたる種々な用途に有用性が見い出せる。例えば、これらの抗体は CMV抗原の検査、特定の CMV感染化細胞の処理等に利用できる。

特に、本明細書でヒト化CHV5を製造したのと同じ方法を、ヒト化CHV109、CHV115又はその他の抗 CMV抗体を製造するために利用できる。

実験

重鎖及び軽鎖cDNAのクローニング

重鎖及び軽鎖可変ドメイン遺伝子に関するcDNAをアンカーハイブリダーゼ連鎖反応により (E.Y.Loh ら、*Science* 243, 217 (1989))、定常細胞にハイブリダイズされ、且つ、*Xba*I 部位を含む 3' プライマーと、*AG* チェルにハイブリダイズされ、且つ、*Eco*R I 部位を含む 5' プライマーを用いてクローンする (図5において手法を示す)。この PCR増幅化断片をシーケンシングのために *Eco*R I 及び *Xba*I により消化し、次いで pUC18ベクターの中にクローンした。CHV5に関しては、2つのガンマ-2a特異性及び2つのカッパー特異性クローンをシーケンス化した。この2つのガンマ-2aクローン及び2つのカッパークローンはそれぞれ配列において同一である。cDNA可変ドメイン配列及びその推定アミノ酸配列を図25A 及び 25B に示す。同様に、当業界によく知られている技術を利用して、CHV109及びCHV115抗体に関するcDNAを獲得してその配列を決定することができる。

キメラ抗体の作製及び発現

キメラ抗体連鎖子の作製及び発現のために 2種類のプラスミドベクターを調製した。プラスミド pVg1-dfr (図26A) はヒトサイトメガロウイルス IE1 プロモーター及びエンハンサー (H.Boshart ら、*Cell* 41, 521 (1985))、前方のイントロンの一部を含むヒトゲノム C_{tr}1 セグメント、並びに選別のためのジヒドロフルオレートリダクターゼ (dfr) 連鎖子 (Sloane ら、*Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 80, 2495 (1983)) を含む。プラスミド pVX (図26B) は pVg1-dfr と類似するが、しかしながらヒトゲノム C_{tr}1 セグメント及び spt 連鎖子を含む。CHV5の重及び軽鎖可変領域の誘導体をポリメラーゼ連鎖反応により cDNA から調製した。5' プライマーは ATG コドンにおいて出発する V 領域にハイブリダイズしており、そして *Xba*I 部位を含み；3' プライマーは J 領域の最後の 15箇のスクレオチドとハイブリダイズしており、そしてスプライスドナーシグナル及び *Xba*I 部位を含む (C.Queen ら、*Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 86, 10029 (1989) を参照のこと)。改質 V 領域を開拓のプラスミドベクターの CHVプロモーターと定常領域の部分イントロンとの間の *Xba*I 部位の中にクローンした。

キメラ抗体の発現のため、重鎖及びカッパー鎖プラスミドをエレクトロポレーションによって S92/0 マウスミエローマ細胞にトランسفектし、そして spt 発現について細胞を選別した。最大量の完全抗体を分離するクローンを ELISA により検定した。精製したキメラCHV5抗体は、CMV感染化ヒト胎芽肺細胞穿刺液の染色により、eB 抗原を発現する CMV感染化細胞に結合することが示された。

ヒト化抗体のコンピューターモデル化

ヒト化抗体において高結合親和力を維持せしめるため、Queen らの一般手順に従った (C.Queen ら、*Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 86, 10029

特表平6-503963 (23)

(1989)。ヒト抗体が元のネズミ抗体とより相間性であるに従い、ネズミ CDRをヒトフレームワークに組合せることによる、親和力を低めうる、CDRへの歪みの導入の傾向が下がるであろう。通常、同一のヒト抗体に由来する重鎖及び軽鎖をフレームワーク配列を提供するために選び、これによりこの2本の鎖を構成するうえでの非適合性の可能性は低まる。RDRPタンパク質配列データーベースに対する配列相間性の探索 (Micro Genie Sequence Analysis Software (Beckman) により実施) に基づき、抗体 *Wol*を、CHV5のヒト化のためのフレームワーク配列を扭うために選んだ。

CHV5可変領域のモデルを作製するためにコンピュータープログラム EWCAD (M. Levitt, J. Mol. Biol. 168, 595 (1983)) を用いた。このモデルは、CDRに十分に密接していくそれらと有効に相互作用するCHV5フレームワークにおけるアミノ酸を決定するために用いた (以下のカテゴリー4)。ヒト化軽及び重鎖CHV5可変領域を設計するには、次の4つのカテゴリーのうちの1つ又は複数に属しない限り、各位置において *Wol*抗体と同一のアミノ酸を選択した：

(1) その位置が CDRに属した、

(2) その位置では、*Wol*アミノ酸がヒト抗体に含まれてあり、一方、その位置では、CHV5アミノ酸がヒト抗体に典型的であった。

(3) その位置が CDRのすぐ近くであった。

(4) 上記したモデルが、そのアミノ酸が抗原結合性領域(CDR)に物理的に近いことを示唆した。

カテゴリー(2)において、「まれ」とは、*Wol*の軽及び重鎖と同一のサブグループにおいてヒト配列の約20%以下で見い出せるアミノ酸を含むものと解釈され (Kabatら、前掲に定義)、そして「典型的」とは、そのサブグループにおいてヒト配列の約25%以上、しかしながら一般には50%以上で見い出せるアミノ酸を含むものと解

釈される。これらのカテゴリーにおける位置に関して、マウスCHV5抗体に由来するアミノ酸を用いた。更に、もし位置が下記のとおりであるなら、その位置は第5カテゴリーに属する。即ち、その位置では *Wol*アミノ酸がヒト抗体に非常にまれであり、そしてCHV5アミノ酸が異なり、しかもまれであるとき。この場合、この位置ではヒト抗体に典型的であるアミノ酸を用いてよい。

各カテゴリーにおけるアミノ酸を表1に示している。いくつかのアミノ酸は複数のカテゴリーに属する。ヒト化CHV5の軽及び重鎖可変ドメインの最終配列を図27A-Bに示し、*Wol*配列と比較する。

表 1

カテゴリー	軽鎖	重鎖
1	24-34, 50-56, 89-97	31-55, 50-66, 99-108 69, 80
2		69, 80
3	49	30
4		24, 27, 28, 30, 97
5		5

ヒト化抗体のための遺伝子の作製のため、一般にマウス配列において見い出せるコドンを利用して、マウスのCHV5鎖中と同一のシグナルペプチド (図28) を含むヒト化重及び軽鎖のタンパク質配列をコードするスクレオチド配列を選別した。複数の複数コドンを変えて、制限部位を作る又は所望されないものを除去した。このスクレオチド配列はキメラ遺伝子において利用されているものと同じスプライスドナーシグナル及び各端での *Xba*I 部位も含んでいた。各遺伝子を4つの重複合成オリゴスクレオチドから作製した。各可変ドメイン遺伝子のため、交互鎖上の2対の重複オリゴスクレオチドを合成し、これは全コード配列並びにシグナルペプチド及びスプライ

スドナーシグナル (図28) を含んでいた。このオリゴスクレオチドはアプライドバイオシステム380B DNA合成装置で合成した。各オリゴは約 110-140 の塩基の長さであり、その約15塩基は重鎖していた。各対のオリゴスクレオチドから二本鎖 DNA断片をクレノウボリメラーゼにより合成し、脱脂酵素で消化し、pUC18ベクターにリゲートし、次いでシーケンス化した。対応の適切な半配列を有するこの2種の断片を次にpVg1-dhfr又は pV6表現ベクターの *Xba*I部位に完全な重及び軽鎖遺伝子を生産するに適切な方向でリゲートした。反応は当業界によく知られる条件のもとで行った (Maniatisら、前掲)。

重鎖及び軽鎖プラスミドをエレクトロポレーションによってSp2/0マウスミエローマ細胞にトランスフェクトし、そしてepi表現のために細胞を選別した。ELISAによって培養上清液中のヒト抗体生産をアッセイすることによりクローニングをスクリーンし、そして最高生産クローニングから抗体を精製した。抗体は組織培養上清液をスタフィロコッカスプロテインA-セファローズCL-4B (ファルマシア) のカラムに通すことによって精製した。結合抗体を 0.2Mのグリシン-HCl、pH 3.0により溶離させ、次いで1Mのトリス、pH 8.0で中和した。この緩衝液をPD10カラム (ファルマシア) に通して PBSに交換した。

一過性トランスフェクションによってもヒト化抗体を製造した。重鎖及び軽鎖プラスミドをDEAE-デキストラント (Gressoら、*Cell. Biol.* 4, 1043 (1984)) によりS194細胞にトランスフェクトし、そして前記の通りに培養からヒト化CHV5抗体を精製した。抗体をヒトIgGにに関するELISAアッセイによって定量した。

ヒト化抗体の性質

ヒト化CHV5抗体をネズミ及びキメラ抗体と比較して特徴化した。

既ヒト化CHV5抗体は、CHV感染化ヒト胎芽細胞 (ATCC CCL 137) の免疫染色により、CHV抗原に対するマウス及びキメラ抗体とほぼ同程度に結合することが示された。96孔プレート中の HEL細胞単層に CHVを 0.01pfu/細胞で感染させ、4日間インキュベートし、37°Cで乾かし、そしてラップして4°Cで保存した。100μlのプロット (PBS, pH 7.4中の5%のカーネーションインスタンミルク) を各ウェルに加え、次いで37°Cで30分インキュベートした。このプロットを吐き出し、そして75μlの2倍希釈系列のマウス、キメラ及びヒト化CHV5抗体をこれらのウェルに加えた。このプレートを37°Cで1hrインキュベートし、次いでプロットで2回洗った (各洗浄は10分間放置した)。75μlの希釈ペルオキシゲーゼ (HRP) コンジュゲート化ヤギ抗マウス又は抗ヒト IgG (IgG) を各ウェルに加え、そして37°Cで1時間インキュベートした。このプレートをPBSで2回洗い、次いで150μlの BRF基質溶液を各ウェルに加えた。室温で発色させた。このプレートを水で洗い、次いで風乾した。これらのウェルを顯微鏡で、CHV感染化細胞上に着色斑を生成せしめる最大発色率の抗体を決定するために調べた。3種類の抗体に関して、検出可能な沈澱を生成せしめる量の抗体は63ng/mlであり、ヒト化CHV5抗体がマウス及びキメラ抗体とほぼ同程度に結合することを示唆した。

マウス及びヒト化CHV5の親和力を別の方法において比較するため、競合実験を行った。前記のCHV感染化 HEL細胞のプレートをプロットと37°Cで30分間インキュベートした。このプロットを吐き出し、そして75μlの PBS中のマウス又はヒト化CHV5の希釈品を各ウェルに加えた。次に PBS中の 125μlの放射性ヨウ素化マウスCHV5 (1 μCi/μg) (28,000cpmを含む) を各ウェルに加え、次いで37°Cで2.5時間インキュベートした。このプレートを PBSで5回洗い、そ

特表平6-503963 (24)

(一般に、Paul, W.E.編、*Fundamental Immunology*、第2版、Raven Press, New York (1989)を参照のこと)。

一つの重要なリソウカインは γ -IFNであり、これは一定のT細胞により分泌される。その抗ウイルス活性に加えて、 γ -IFNはナチュラルキラー (NK) 細胞を刺激し、マクロファージを活性化し、そして細胞の表面のMHC分子の発現を刺激する (Paul前掲、頁622-624)。従って、 γ -IFNは一般に免疫機能の数多くの指標を増強するのに働き、そしてかかる増強が所望される、例えば癌の処置のような場合において、治療薬の理学的な候補となる。他方、免疫系が過剰活性である疾患症例、例えば自己免疫疾患及び器官移植拒絶において、 γ -IFNの拮抗剤が γ -IFNの刺激作用を中和することによりこの疾患を処置するために用いられる。

1つの種類の γ -IFNの有効な拮抗薬は、それに結合し、そして中和するモノクローナル抗体である (例えばVan der Heideら、*J. Gen. Virol.*, 67, 1059 (1986)を参照のこと)。移植の試験管内及び生体内マウスモデルにおいて、抗- γ -IFN抗体が拒絶を遅らせる又は防ぐことが示されている (Landoら、*Science*, 239, 176 (1986)及びRosenbergら、*J. Immunol.*, 144, 4648 (1990))。 γ -IFNに対するモノクローナル抗体による、全身性エリテマトーデス (SLE) 症状の発症に対するマウスプローランの処置は、この疾患の免疫を有意に遅らせた (Jacobら、*J. Exp. Med.*, 166, 798 (1987))。一定の条件のもとで、抗- γ -IFN抗体はラットにおけるアジュバント関節炎を緩和し (Jacobら、*J. Immunol.*, 142, 1600 (1989))、この抗- γ -IFNがヒト患者における一定のケースのリウマチ性関節炎に有効であることを示唆している。患者における多発性硬化症 (MS) は γ -IFNによる起因により悪化し (Paolitchら、*Neurology*, 36 (付1), 285 (1986))、従って抗- γ -IFN抗体はMSを緩和しうる。

して各ウェルの内容物を2%のSDS 200μlで可溶化し、そしてカウントした。上昇する濃度のマウス及びヒト化CHVSはほぼ同程度に放射性ラベル化CHVSの結合を阻害し (図29)、従ってヒト化CHVSはマウスCHVSとほぼ同じ結合親和力を有する。異常な抗体はこのアッセイにおいて結合しなかった。

CHVを中和するヒト化CHVSの能力をマウスCHVSのそれと比べた。マウス及びヒト化CHVSを96穴プレートのウェルの中で、100μlのDMB培地+2%のFCSの中に2倍に順次に希釈した。100の50%一組培養物感染用量 (TCID₅₀) 単位を含むように希釈したCHV 100μlを各ウェルに加え、そして37℃で60分間インキュベートした。抗体-ウイルス混合物の各ウェル中の半数密度測定のウェルに加え、これより培地を除去了した。細胞を5日間インキュベートし、そして顕微鏡で各ウェル中の細胞障害効果 (CPE) を観察した。90%でCPEを阻害する最も高い希釈率の抗体が、抗体の中和能力の測定のための尺度である。このヒト化CHVS抗体はマウスCHVS抗体とほぼ同程度にCHV抗体を中和した。

図 V

哺乳動物において、免疫応答は外来物質、即ち抗原に特異的に相互作用するいくつかの細胞のタイプにより媒介される。このような細胞タイプのうちの1つであるB細胞は、抗体の生産のもとである。その他の細胞のタイプ、T細胞は、ウイルスにより感染された細胞を破壊する、又はB細胞及びその他の造血細胞 (T細胞を含む) の両者の生体内機能をコントロールする広範囲にわたる様々な細胞のサブセットを含む。第3の細胞タイプ、マクロファージは、主要組織適合性複合体 (MHC) タンパク質に関連する抗原を処理及びT細胞に提供する。これらの細胞タイプ間の連絡はリソウカイン、例えばインターロイキン1～6及び γ -IFNにより複雑な方法で媒介される

る。従って、抗- γ -IFN抗体はこれら及びその他の自己免疫疾患の処置において有効でありうる。

ヒト患者の処置のため、ヒト γ -IFNに結合してそれを中和するネズミモノクローナルが利用されうる (例えばYasunotoら、*Microbiol. Immunol.*, 32, 339 (1988)を参照のこと)。IF2と命名され、ヒト γ -IFNを中和し、そして γ -IFNの細胞レセプターへのその結合を阻害する別のネズミモノクローナル抗体を本明細書に開示している。然しながら、非ヒトモノクローナル抗体は、例えばIF2の利用はヒトの効率、特に繰り返し治療法において一定の欠点を有している。

本発明に従い、 γ -IFNエピトープに特異的に反応性なヒト化免疫グロブリンを提供する。少なくとも約10⁷M⁻¹、そして好みしくは10⁸M⁻¹～10¹⁰M⁻¹又はそれより強力な、 γ -IFNに対する結合親和力を有するこれらの免疫グロブリンは例えばヒト γ -IFNを中和することができる。既ヒト化免疫グロブリンはヒトフレームワークを有しており、そして典型的にはマウス免疫グロブリン、詳しくは γ -IFNに反応性な免疫グロブリンに由来する1又は複数の組合せ決定領域 (CDR) を有するであろう。好みしい意味において、1又は複数のCDRはIF2抗体に由来するであろう。大量に経済的に製造されうる本発明の免疫グロブリンは例えば種々の技術によるヒト患者における自己免疫障害の処置において有用である。

ある観点において、本発明は γ -IFNの所望のエピトープに結合することのできる免疫グロブリン、例えばモノクローナル抗体IF2に由来する重鎖及び/又は軽鎖のCDRをコードする組換えDNAセグメントに開示する。このような領域をコードするDNAセグメントは一般に適当なヒトフレームワーク領域をコードするDNAセグメントと連結されているであろう。モノクローナル抗体IF2の重鎖及び軽鎖

のCDRを含んで成るポリペプチド鎖を発見に基づいてコードする典型的なDNA配列を図30に含ませている。コドン密度及び重要でないアミノ酸置換に基づき、以下に述べる通り、その他のDNA配列がこれららの配列に容易にとって代わることができる。

他方、断片が1又は複数の免疫グロブリン活性 (例えば補体固定活性) を有する、一次抗体構造の一部のみを含んで成るポリペプチド断片を製造することができる。これらのポリペプチド断片は、当業界によく知られている方法による完全抗体のタンパク質分解によって、又は部位特異的突然変異説を利用して、ベクター pVII及びpVII-ckfr (図31) における所望の位置に停止コドンを導入する (例えばCH1の後ろに導入してFab断片を作る、又はヒンジ領域の後ろに導入してFab'断片を作る) ことによって製造されうる。一本鎖抗体はVLと VHをDNAリンクで連結することによって製造されうる (Houstonら、前掲、及びBeldi前掲を参照のこと)。

本発明の抗体は典型的には自己免疫疾患の処置において各別に用途が見い出せるであろう。例えば、腫瘍に適する典型的な疾患症状は移植対応生疾患及び器官、例えば心臓、肺、腎臓、肝臓、他の移植を受けた患者における移植拒絶が含まれる。その他の疾患には自己免疫疾患、例えばI型糖尿病、多発性硬化症、リウマチ性関節炎、全身性エリテマトーデス及び重慶性筋力症が含まれる。

本発明のヒト化免疫グロブリンはその他の抗体、特にその他のリソウカイン又はリソウカインレセプターに反応性なヒト化抗体と組合せて利用することもできる。例えば、ヒト化免疫グロブリンの混合物が反応しうる適当な抗原にはインターロイキン1～10、並びにIL-2レセプターのp55及びp75鎖が含まれる (Waldmann, *Adv. Rev. Biochem.*, 58, 875 (1989)及びGauseら *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 10029 (1989)を参照のこと)。その他の抗原には、疾患の

もととなる細胞上のそれ、例えば、いわゆる「細胞分類」('Clusters of Differentiation') 抗原が含まれる(Leucocyte Typing III, A.J. McMichael編、Oxford University Press (1987))。

これらの抗体は化学治療剤と一緒に付与される独立投与型組成物としても利用される。典型的には、この試薬には非ステロイド系抗炎症剤(例えばアスピリン、イブプロフェン)、ステロイド(例えばプレドニゾン)及び免疫抑制剤(例えばシクロスボリンA、シトキサン)が含まれるが、しかしながら当筆者によく知られる莫大な数の異なる試薬の利用も含んで成る。本発明の好みしい薬品製剤は γ -IPN 分泌細胞を殺す免疫毒性の対象の免疫グロブリンの利用を含んで成る。

本発明のヒト化抗体は試験管内における広範囲にわたる様々な用途に有用性が見い出せる。例えば、これらの抗体は γ -IPN 抗原の検査等に利用できる。

実験

重複及び重複cDNAのクローニング

重複及び重複可変ドメイン遺伝子に関するcDNAをアンカー化ボリメラーゼ連鎖反応により(B.Y. Lohら、*Science* 243, 217 (1989))、正常領域にハイブリダイズされ、且つ、*Bind*II部位を含む3'プライマーと、dGテールにハイブリダイズされ、且つ、*Eco*II部位を含む5'プライマーを用いてクローニングする(図6において手法を示す)。このPCR増幅化断片をシーケンシングのために*Eco*II及び*Bind*IIにより消化し、次いで pUC18ベクターの中にクローンした。AP2に関しては、2つのガムマー-2 α 特異性及び2つのカッパー特異性クローンをシーケンス化した。この2つのガムマー-2 α クローン及び2つのカッパークローンはそれぞれ配列において同一である。cDNA可変ドメイン配列及びその推定アミノ酸配列を図30に示す。

キメラ抗体の作製及び発現

キメラ抗体遺伝子の作製及び発現のために2種類のプラスミドベクターを調製した。プラスミド γ -IPN-*dhfr*(図31A)はヒトサイトメガロウイルスIE1プロモーター及びエンハンサー(N.Bosbarら、*Cell* 41, 521 (1985))、前方のイントロンの一部を含むヒトゲノム $\text{C}\gamma 1$ セグメント、並びに選別のためのジヒドロフォレートリダクターゼ(*dhfr*)遺伝子(*Sinnesen*ら、*Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 80, 2495 (1983))を含む。プラスミド pVII(図31B)は pVgI-dhfr と類似するが、しかしながらヒトゲノム $\text{C}\gamma 2$ セグメント及び gpt 遺伝子を含む。AP2の重及び軽鎖可変領域の読導体をボリメラーゼ連鎖反応によりcDNAから調製した。5'プライマーは ATGコドンにおいて出発するV領域にハイブリダイズしており、そして Xba I部位を含み；3'プライマーはJ領域の最後の15個のヌクレオチドとハイブリダイズしており、そしてスプライスドナーシグナル及び Iba I部位を含む(*C.Queen*ら、*Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 86, 10029 (1989)を参照のこと)。改変V領域を間違のプラスミドベクターのCHVプロモーターと正常領域の部分イントロンとの間の Iba I部位の中にクローンした。

キメラ抗体の発現のため、重複及びカッパー鎖プラスミドをエレクトロポレーションによって $\text{Sp}2/0$ マウスエローマ細胞にトランسفектし、そして gpt 発現について細胞を選別した。最大量の完全抗体を分離するクローンをELISAにより検定した。キメラAP2抗体は、ELISAにより、 γ -IPN に結合することが示された。ヒト化抗体のコンピューターモデル化

ヒト化抗体において高結合親和力を維持せしめるため、*Queen*らの一般手順に従った(*C.Queen*ら、*Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 86, 10029 (1989))。ヒト抗体が元のネズミ抗体とより相容性であるに従い、

ネズミ CDRをヒトフレームワークに組合せることによる、親和力を認めうる、CDRへの重みの導入の傾向が下がるであろう。通常、同一のヒト抗体に由来する重複及び軽鎖をフレームワーク配列を提供するために選び、これによりこの2本の鎖を構成するうえでの非適合性の可能性は低まる。VFRタブ配列データベースに対する配列相容性(Micro Genie Sequence Analysis Software (Beckman)により実施)に基づき、抗体Buを、AP2のヒト化のためのフレームワーク配列を組うるために選んだ。

AP2可変領域のモデルを作製するためにコンピュータープログラム ENCAID (M.Levitt, *J.Mol.Biol.* 168, 895 (1983))を用いた。このモデルは、CDRに十分に密接していながらも相互作用するAP2フレームワークにおけるアミノ酸を決定するために用いた(以下のカテゴリー4)。ヒト化親及び重複AP2可変領域を設計するには、次の4つのカテゴリーのうちの1つ又は複数に属しない限り、各位置においてBu抗体と同一のアミノ酸を選択した：

- (1) その位置が CDRに属した。
- (2) その位置では、Buアミノ酸がヒト抗体に含まれてあり、一方、その位置では、AP2アミノ酸がヒト抗体に典型的であった。
- (3) その位置が CDRのすぐ近くであった。
- (4) 上記したモデルが、そのアミノ酸が抗原結合性領域(CDR)に物理的に近いことを示唆した。

カテゴリー(2)において、「まれ」とは、Buの軽及び重鎖と同一のサブグループにおいてヒト配列の約20%以下で見い出せるアミノ酸を含むものと解釈され(*Yabu*ら、前掲に記載)、そして「典型的」とは、そのサブグループにおいてヒト配列の約25%以上、しかしながら一般には50%以上で見い出せるアミノ酸を含むものと解釈される。これらのカテゴリーにおける位置に関して、マウスAP2抗

体に由来するアミノ酸を用いた。更に、もし位置が下記のとおりであるなら、その位置は第5カテゴリーに属する。即ち、その位置ではBuアミノ酸がヒト抗体に非常にまれであり、そしてAP2アミノ酸が異なり、しかもまれであるとき。この場合、この位置ではヒト抗体に典型的であるアミノ酸を用いてよい。

各カテゴリーにおけるアミノ酸を表10に示している。いくつかのアミノ酸は複数のカテゴリーに属する。ヒト化AP2の軽及び重鎖可変ドメインの最終配列を図32に示し、Bu配列と比較する。

表 10		
カテゴリー	軽鎖	重鎖
1	24-34, 50-56, 89-97	31-35, 50-66, 99-106
2	48	93, 95, 98, 107, 108, 109, 111
3		30, 98, 107
4	48, 70	27, 28, 30, 98, 107
5	63	

ヒト化抗体のための遺伝子の作製のため、一概にマウス配列において見い出せるコドンを利用して、典型的な免疫グローバル配列と共に重及び軽鎖のタンパク質配列をコードするヌクレオチド配列を選別した。複数の複数コドンをえて、制限部位を作る又は所要されないものを除去した。このヌクレオチド配列はキメラ遺伝子において利用されているものと同ヒスプライスドナーシグナル及び各端での Iba I部位も含んでいた。各遺伝子を4つの重複合成オリゴヌクレオチドから作製した。各可変ドメイン遺伝子のため、交互鎖上の2対の重複オリゴヌクレオチドを合成し、これは全コード配列並びにシグナルペプチド及びスプライスドナーシグナル(図33)を含んでいた。このオリゴヌクレオチドはアブライドバイオシ

特表平6-503963 (26)

システム380B DNA合成装置で合成した。各オリゴは約 110-140 の塩基の長さであり、その約15塩基は重複していた。各対のオリゴスクレオチドから二本鎖 DNA断片をクレノウボリメラーゼにより合成し、核酸酵素で消化し、pUC18ベクターにリゲートし、次いでシーケンス化した。対応の適切な半配列を有するこの2種の断片を次にpVet-dbir又はpVH発現ベクターのXba I部位に完全な重複及び酵素活性を生産するに適切な方向でリゲートした。反応は当業界によく知られる条件のもとで行った (Magdalenoら、前掲)。

重複及び酵素プラスマドをエレクトロボレーションによってSp2/0マウスミエローマ細胞にトランスフェクトし、そしてepi発現のために細胞を選別した。ELISAによって培養上清液中のヒト抗体生産をアッセイすることによりクローンをスクリーニングし、そして最良生産クローンから抗体を精製した。抗体は組織培養上清液をスクアフィロコッカスプロテインA-セファローズCL-4B (ファルマシア) のカラムに通すことによって精製した。結合抗体を0.2Mのグリシン-BSA、pH 9.0により溶離させ、次いで1Mのトリス、pH 8.0で中和した。この緩衝液をPD10カラム (ファルマシア) に通してPBSに交換した。

ヒト化抗体の性質

ヒト化AF2抗体をネズミ及びキメラ抗体と比較して特異化した。このヒト化抗体はELISAアッセイにおいて、マウス及びキメラ抗体と類似の状態で γ -IFNに結合し、これが γ -IFNを認識することが示唆された。

マウスAF2抗体とヒト化AF2抗体の結合親和力を比較するため、競合ELISAアッセイを行った。ELISAプレートに、各ウェルの中にPBS中の γ -IFNの500ng/mlの溶液100 μ lを加え、そして4℃で一夜インキュベートすることによってヒト組織え γ -IFNでコー

トした。その後の工程は室温で行った。 γ -IFN溶液を除去し、そして各ウェルに200 μ lのELISA緩衝液200 μ l (PBS中の0.1%のツイーン20、1%の牛血清アルブミン) を加え、そして1hrインキュベートした。溶液を除去した後、PBS中の極々少量の競合抗体 (マウスAF2又はヒト化AF2) 100 μ lを各ウェルに、優れたBLISA応答を示すように予め決定しておいた一定量のビオチニル化AF2と共に加えた。このプレートを1時間インキュベートし、次いでELISA緩衝液で3回洗った。100 μ lのPBS中の、過剰となるように予め決定しておいた一定量の西洋ワサビペルオキシダーゼ(BRP) - コンジゲート化ストレアトアビシンを各ウェルに加え、そして30分インキュベートした。このプレートをELISA緩衝液で3回洗い、そしてBRPのための基質溶液100 μ lを各ウェルに加えた。このプレートを10-30分インキュベートし、そして各ウェルの光学密度をELISAリーダー (BioRad) により決定した。競合抗体マウスAF2及びヒト化AF2の上昇する濃度に伴う光学密度の減少をプロットした。マウスAF2及びヒト化AF2は両様に競合し合い、それらの γ -IFNに対する結合親和力がほぼ同じであることが示された。この手順は当業界によく知られている (例えば、HarlowとLane、前掲)。

γ -IFNの重要な生物活性は細胞上のクラスII HLA抗原の発現の誘導にある。この活性中和するマウス及びヒト化AF2の能力を決定するため、1.0 μ gのDHB4培地+10%のFCS中の約 5×10^4 のRS2941細胞 (Bebasら、J. Immunol. 130, 1492 (1983)) を24穴プレートの各ウェルの中に分注した。一夜のインキュベーション後、0.1mMのインターフェロン及び極々少量のマウス又はヒト化AF2をこの細胞に加え、そしてこのプレートを72時間インキュベートした。この細胞を0.05MのEDTAでこのプレートから取り出し、HLA-D抗原に対するアメリカンタイプカルチャーコレクション (ATCC) 由来の

モノクローナル抗体L243で染め、洗い、FITCコンジュゲート化ヤキ抗マウスIgGで染め、そしてFACScan (Becton-Dickinson) で分析した。上昇する濃度のマウスAF2は細胞の蛍光を低め (図34)、この抗体が γ -IFNによるHLA-Dの誘導を防ぐことが示唆された。このヒト化AF2はこのアッセイにおいてマウスAF2と同じよう働き、これが γ -IFNの生物活性を中和することが示された。

以上より、本発明のヒト化免疫グロブリンは他の γ -IFN特異的抗体に勝る倍大なる利点を授けることが期待されるであろう。マウスモノクローナル抗体と比べ、本ヒト化免疫グロブリンはより経済的に製造でき、そして外来的アミノ酸配列を実質的に少なく含む。ヒト患者に注射された後のこの抗原性の認められた傾向は有意確な治療的改善を示す。

本明細書に挙げた全ての文献及び特許明細書は本明細書の中に参考として組入れられる。本発明を例示及び理解を促すための実施例によってある程度詳しく説明してきたが、一定の変更及び改良は添付の請求の範囲に属するであろう。

1	D I V L T Q S P A S L A V S L G Q R A T
1	E I V M T Q S P A T L S V S P G E R A T
21	I S C R A S O S V S T S T S T Y N Y H H H Y
21	L S C R A S O S V S T S T S T Y N Y H H H Y
41	Q Q X P G O P P K L L I K Y A S N L E S
41	Q Q X P G O S P R L L I K Y A S N L E S
61	G V P A R F S G S G F G T D F T L N I H
61	G I P A R F S G S G F G T D F T L N I H
81	P V E E D T V T Y Y C O H S M E I P Y
81	R L E S E D F A V Y Y C O H S M E I P Y
101	T F G G G T K L E I K
101	T F G Q G T R V E I K

FIG. 1A

1	E H I I L V E S G G G L V K P G A S L K L
1	E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L
21	S C A A S G F T F S N Y G L S W V R O T
21	S C A A S G F T F S N Y G L S W V R Q A
41	S D R R L E W V A S I S R G G G R I Y S
41	P G K G L E W V A S I S R G G G R I Y S
61	P D N L K G R F T I S R E D A K N T L Y
61	P D N L K G R F T I S R E D A K N T L Y
81	L Q M S S L K S E D T A L Y Y C L R E G
81	L Q M N S L Q A E D T A L Y Y C L R E G
101	I Y Y A D Y G F F D V W G T G T I V I V
101	I Y Y A D Y G F F D V M G Q G T L V T V
121	S S
121	S S

FIG. 1B

特表平6-503963 (27)

1 D I V M T Q S H K F H S T S V G D R V S
 1 D I Q M T Q S P S T L S A S V G D R V T
 21 I T C K A S Q D V G S A V V W H Q Q K S
 21 I T C K A S Q D V G S A V V W H Q Q K P
 41 G Q S P K L L I X K A S T R H T G V P D
 41 G K A P K L L I X K A S T R H T G V P S
 61 R F T G S G S G T D F T L T I T N V Q S
 61 R F T G S G S G T D F T L T I S S L Q P
 81 E D L A D Y F C Q Q X S I F P L T F G A
 81 D D F A T Y F C Q Q X S I F P L T F G O
 101 G T R L E L K
 101 G T K V E V K

FIG. 2A

1 D I V L T Q S P A S L A V S L G Q R A T
 1 D I Q M T Q S P S S E L S A S V G D R V T
 21 I S C R A S E S V D N Y G I S P M N W E
 21 I T C R A S E S V D N Y G I S P M N W E
 41 Q Q K P G Q P P K L L I X A A S H Q G S
 41 Q Q K P G K A P K L L I X A A S H Q G S
 61 G V P A R F S G S G S G T D F S L N I S
 61 G V P S R F S G S G S G T D F T L N I S
 61 P M E E D D T A M Y F C Q Q S K E V P W
 81 S L Q F D D F A T Y Y C Q Q S K E V P W
 101 T F G G G T X L E I K
 101 T F G Q G T X V E I K

FIG. 3A

1 Q V Q L Q Q S P D A E L V K P G A S V K I
 1 Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K V
 21 S C K V S G Y T F T D H T I H W M K Q R
 21 S C K A S G Y T F T D H T I H W M R Q A
 41 P E Q G L E W F G Y I Y P R D G H T R Y
 41 P G Q G L E H F G Y I Y P R D G H T R Y
 61 S E K F K G K A T L T A D K B A S T A Y
 61 A E K F K G K A T L T A D E S T H T A Y
 81 M H L N S L T S E D S A V Y F C A R G R
 81 M E L S S L R S E D T A V Y F C A R G R
 101 D S R E R N G F A Y H G Q G T L V T V S
 101 D S R E R N G F A Y H G Q G T L V T V S
 121 A
 121 S

FIG. 2B

1 E V Q L Q Q S G P E L V K P G A S V K I
 1 Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K V
 21 S C K A S G Y T F T D Y N M H W V K Q S
 21 S C K A S G Y T F T D Y N M H W V R Q A
 41 H G K S L E N I G Y I Y P Y N G G T G Y
 41 P G Q G L E N I G Y I Y P Y N G G T G Y
 61 N Q K F K S K A T L T V D H S S S T A Y
 61 N Q K F K S K A T I T A D E S T H T A Y
 81 M D V R S L T S E D S A V Y Y C A R G R
 81 M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R G R
 101 P A M D Y W G Q G T S V T V S S
 101 P A M D Y W G Q G T I L V T V S S

FIG. 3B

1 Q I V L T Q S P A I M S A S P G E K V T
 1 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T
 21 M T C S G S S S V S F M Y W Y Q Q R P G
 21 I T C S G S S S V S F M Y W Y Q Q K P G
 41 S S P R L L I Y D T S N L A S G V P V R
 41 K A P K L L I Y D T S N L A S G V P V R
 61 F S G S G S G T S Y I S L T I S R M E A E
 61 F S G S G S G T D I T F T I S S L Q P E
 81 D A A T Y Y C Q Q W S T Y P L T F G A G
 81 D I A T Y Y C Q Q W S T Y P L T F G O G
 101 T K L E L K
 101 T K V E V K

FIG. 4A

1 D I V L T Q S P A T L S V T P G D S V S
 1 E I V L T Q S P G T L I L S P G E R A T
 21 L S C R A S Q S I S N N L H W Y Q Q K S P
 21 L S C R A S Q S I S N N L H W Y Q Q K P
 41 H E S P R L L I K Y A S O S I S G I P S
 41 G Q A P R L L I K Y A S O S I S G I P D
 61 R F S G S G S G T D F T L S V N G V E T
 61 R F S G S G S G T D F T L T I S R L E P
 81 E D F G H Y Y F C Q Q D S N S W P H T F G G
 81 E D F A V Y Y F C Q Q D S N S W P H T F G C
 101 G T K L E I K
 101 G T K V E I K

FIG. 5A

1 Q V Q L K Q S G P G L V Q P S Q S L S I
 1 E V Q L L E S G G G C L V Q P G Q S L R I
 21 T C T V S G F S V T S Y G V H H I R Q S
 21 S C A A S G F T V I S Y G V H H V R Q A
 41 P G K G L E N L G V I H S G G S T D Y N
 41 P G K G L E W V G Y I H S G G S T D Y N
 61 A A F I S R L T I S K D N S K S Q V F F
 61 A A F I S R F T I S R D N S K N T L Y L
 81 K V N S L Q P A D T A I Y Y C A R A G D
 81 Q M N S L Q A E D T A I Y Y C A R A G D
 101 Y N Y D G F A Y W G Q G T L V T V S A
 101 Y N Y D G F A Y W G Q G T L V T V S S

FIG. 4B

1 E V Q L Q Q S G P E L V K P G A S H K I
 1 Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V R V
 21 S C K A S V Y S F T G Y T M N W V K Q S
 21 S C K A S G Y S F T G Y T M N W V R Q A
 41 H G Q N L E N I G L I N P Y H G G T S Y
 41 P G K G L E W V G Y I H S G G S T D Y N
 61 N Q K F K G K A T L T V D K S S M T A Y
 61 N Q K F K G R V T V S L K P S E N Q A Y
 81 M E L L S L T S A D S A V Y Y C T R R G
 81 M E L S S L T S A D S A V Y Y C T R R G
 101 F R D Y S M D Y W G Q G T S V T V S S
 101 F R D Y S M D Y W G Q G T L V T V S S

FIG. 5B

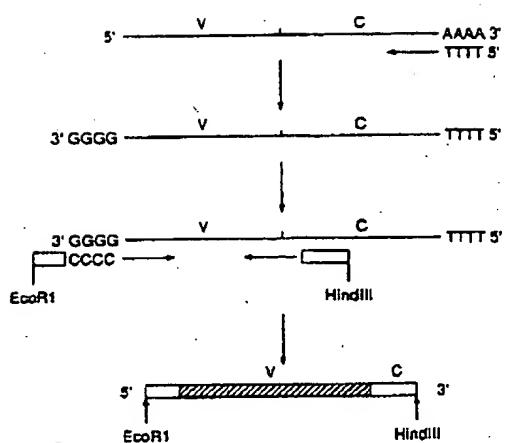


FIG. 6

30 ATGGATTTCAAGTCAGATTTCAAGCTTCTCTAATCAGTGCCCTCAGCTACAGGCC
H D E O V Q I F S P L L I S A S V I L S 60
90 AGCAGCACACATTCTCTCACCCAGTCAGCTCCAGAACATGTCGCTCTCCAGGGGCCAG
K G Q I V L T Q S P A I M H A S P G E R 120
150 GTGACCATGACCTGCGATGGCACCTCAAGCTGTAAGTTCATGTACTGCTGAGCAGCACAG
V T H T C G G G R A Y H E M Y W Y Q Q R 180
210 CCAGGATCCCTCCCGCAGACTCTGATTATGACACATCCAACTGGCTCTGGACTCCCT
F G S S Y R I L I Y D T S N L A S G V 240
270 GTTCGCTTCAGTCAGTCAGTGGCTCTGGACCTCTACTCTCTCACAAATCAGCCGAGATGGAG
V R F S G S G S Q T S Y S L T I S R M E 300
330 CCTGAACATGCTGCCACTTAACTTCGACAGCTGGAGTACTTACCCGCTCACGGT
A E D A A T Y Y C Q D W S T Y P L I F G 360
GCTGGCACCACCTGGACCTGAA
A G T K L E L K

FIG. 7A

30 ATGGCTGCTGGGGCTGCTTCTGCTGCTGACATTCCTAACGCTGCTGCTATCCAG
H A V L G L L F C L V T F P S C V L S Q 60
80 GTGACGCTGAGGACTCAGGACCTGGCCCTAGTCGCGACCTCACAGACCTGTCATGCC
V O L K Q S G F G V Q F S Q S L S I I 120
150 TGCACAGTCCTGGTTCTCAGTAAACAGTATGGTGACTGGAATGGCAGTCCTCCCA
C T V S G F S V T S Y G V H W I R Q S P 180
210 GGAAAGGGCTGGAGTGGCTGGGAGTCATATGGAGTGGCTGGAGCACAGACTATAATGCA
G X G L B W I G V I W S G G S T D Y H A 240
270 CCTTCATATCAGACTGACCATCAGCAAGGAACTCCAGAGCCAGTTCTTAA
A T L E R L T I S K D N S K S Q V Y F K 300
330 CTGACACTCTGCAACCTGGTACACACAGCCATATACTTCTGGAGACGGCTGGGACTAT
V H S L Q P A D T A I Y Y C A R A G D Y 360
390 AATTCAGCAGCTTTCGCTTACTGGGGCAAGGGACTCTGGTCACTGTCCTGG
H Y D G F A Y W G O G T C L V T V S A

FIG. 7B

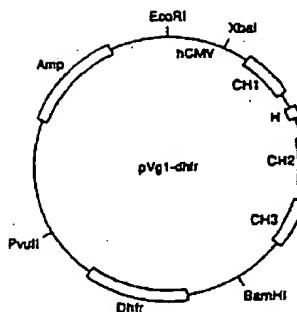


FIG. 8A

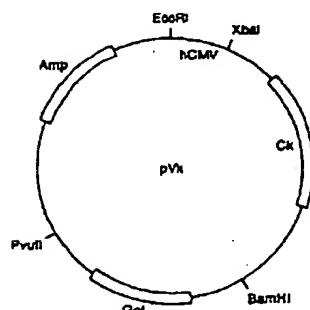


FIG. 8B

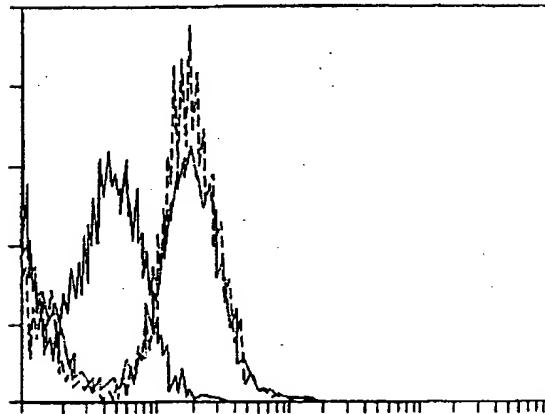


FIG. 9

1 D I Q M T Q S P S S L S V S V G D R V T
 1 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T
 21 I T C Q A S Q N V N A Y L N H Y Q Q K P
 21 I T C S G S I S V S K M Y W Y Q Q K P
 41 G L A P K L L I Y G A S T R E A G V F S
 40 G K A P K L L I Y D T S N L A G V P S
 61 R F S G S G S G T D E T F T I S S L Q P
 60 R F S G S G S G T D V T F T I S S L Q P
 81 E D I A T Y Y C Q Q Y N N W P P T F G Q
 80 E D I A T Y Y C Q Q N S T X P L I F G Q
 101 G T K V E V K
 100 G T K V E V K

FIG. 10A

1 A V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L
 1 E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L
 21 S C A A S G P T F S A S A M S N V R Q A
 21 S C A A S G F T V I S Y G V R N V R Q A
 41 P G K G L E N V A W X Y E N G N D K H Y
 41 P G K G L E N V G V I W S G G S T D Y
 61 A D S V N G R E T I S R N D S K N T L Y
 60 N A A F I S R E T I S R D N S K N T L Y
 81 L Q M N G L Q A Z V S A I Y Y C A R D A
 80 L Q M N S L Q A E D I A I Y Y C A R A
 101 G P Y V S P T F F A H W G Q G T L V T V
 99 G D Y H Y D G F A Y W G Q G T L V T V
 121 S S
 118 S S

FIG. 10B

vc13

10 20 30 40 50 60
 TCTCTGCT ACCAGTACAT GAACTTACA CTTCAGTCG CACTGCAGGT GATGGTGAC
 70 80 90 100 110 120
 CGGTACCCA CTGAGGACT GAGGCTAGAT GGAGCTGG TCATTTG

vc14

10 20 30 40 50 60
 CAGTACTGG TACCAAGACA ACCAAGGABA AGCTCGAAA CTCTGATTT ATGACACATC
 70 80 90 100 110 120
 CAACCTGCT TCGGAGTCC CTTCGGCTT CAGTGGCTT GGCTCTGGG CGGATTACAC
 130
 CTTACACATC TCTTCA

vc15

10 20 30 40 50 60
 TGTCGTAGA AANGTGTACT TACGTTTAC CTCGACCTTG GTCGCTTGAC CGAACCTGAG
 70 80 90 100 110 120
 CGGGTAACTA CTGCACTGCT GGCAGTAACTA AGTGGCTATA TCTTCGGCTT GAAGTGTAGA
 130
 GATGTAAAG GTGTAA

vc16

10 20 30 40 50 60
 CACAATGAGA CCACCATGGA TTTCAAGTG CAGATCTCA GCTTCCTGCT AATCAGTGGC
 70 80 90 100 110 120
 TCAGTCATAC TCTCCAGGG AGATATTCAA ATGACCCAGT CTCAGATCT

FIG. 11A

vc11

10 20 30 40 50 60
 TAGTCGTGCG ACCACCACT CCAATCACT CCCACCACT CGAGTCCTT TCCAGGAGCC
 70 80 90 100 110 120
 TGGCGGACCC AGTGTACACCC ATAACTTGTGTT AGGTGAAAC CACTGGGGC ACAAGACAGT
 130
 CTCAGAGATC CTCCTGGC

vc12

10 20 30 40 50 60
 TGGTGGCTG ACAGACTATA ATGCACTT CATACTCGA TTTACCATCA CGAGAGACAA
 70 80 90 100 110 120
 CACCAAGAAC ACAGCTGATAC TOCAGATGAA TAGCTGCGA GCGGAGGACA CAGCCATATA
 TTAATG

wp54

10 20 30 40 50 60
 ACACCTCTAGA CCACCATGCG TGTCTTGGGG CTGCTCTTCT GCGTGGTGAC ATTCCCAAGC
 70 80 90 100 110 120
 TGTGTCTTAT CGCGCTGCTCA GCTGCTAGAG AGTGTGCGG GTCTCTGCA GCGAGGAGGA
 130
 TCTCTGAGAC

wp57

10 20 30 40 50 60
 ACACCTCTAGA AGTTAGGACT CACCTGAAGA GACAGTGACCC AGAGTCCTTT GCGCCCGAGTA
 70 80 90 100 110
 AGCAAAACCG TGTAAATAT AGTCCCGAGC TCTGGCACAA TATATATGG CTGTGTCT

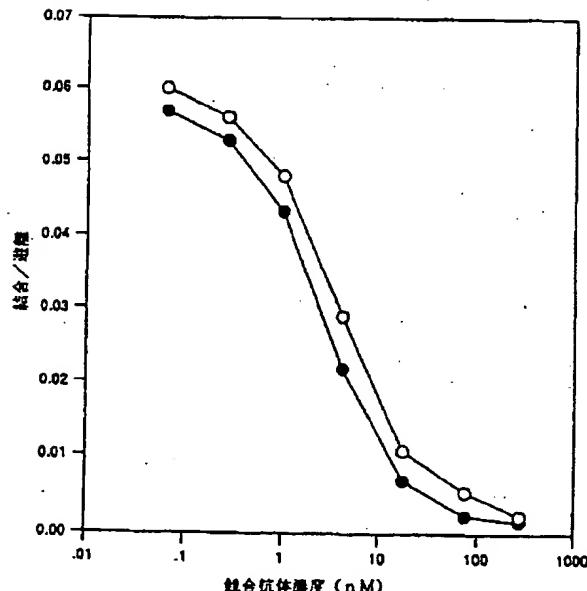


FIG. 12

FIG. 11B

特表平6-503963 (30)

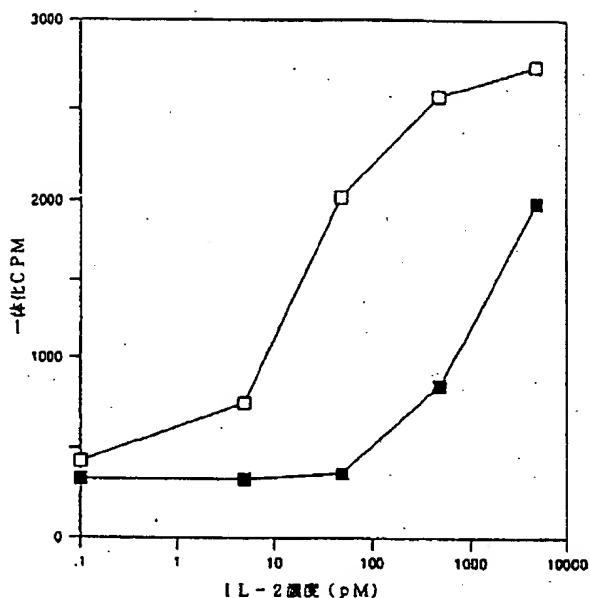


FIG. 13

1 5 10 15 20
 1 0 V Q L Q Q S D A E L V K P G A S V K
 1 0 V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K
 21 25 30 35 40
 21 S C K V S G Y T F T D K T I H W M K O R
 21 S C K A S G Y T F T D K T I H W M R G A
 41 45 50 52 a 55
 41 P E Q G I E W F G Y T Y P R D G H T R Y
 41 P G Q G I E W F G Y T Y P R D G H T R Y
 60 65 70 75
 60 S E K T F G K A T L T A D K S A S T A Y
 60 A E K F F G K A T I T A D E S T N T A Y
 80 82 a-b c 85 90 95
 80 M H L B S S L T S E D S A V Y F C A R G R
 80 M E L S S G L R S E D T A V Y F C A R G R
 97 100 a b c d 105 110
 97 D S R E R N G F A Y W G Q G T L V T V S
 97 D S R E R N G F A Y W G Q G T L V T V S
 113
 113 A
 113 S

FIG. 14A

1 5 10 15 20
 1 D I V H T D S H K F M S T S V G D R V S
 1 D I Q H T D S P S T L S A S V G D R V T
 21 25 27 a b c d 30 35
 21 I S C R A S Q S V S T S T Y N Y N H W Y
 21 I S C R A S Q S V S T S T Y N Y N H W Y
 37 40 45 50 55
 37 Q Q K P G Q P P K L L I K Y A S H N L E S
 37 Q Q K P G Q S P R L L I K Y A S H N L E S
 57 60 65 70 75
 57 G V P A R F S G S G F G T D F T L N I H
 57 G V P A R F S G S G F G T D F T L N I H
 77 80 85 90 95
 77 P V E E E D T V T Y Y C Q H S W E I P Y
 77 R L E S E D F A V Y Y C Q H S W E I P Y
 97 100 105 107
 97 T F G G G T K L E I K
 97 T F G G Q G T R V E I K

FIG. 14B

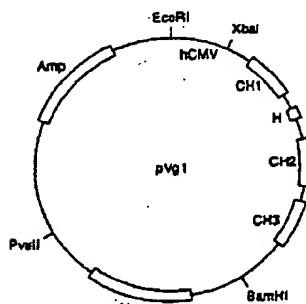


FIG. 15A

1 5 10 15 20
 1 D I V H T D S H K F M S T S V G D R V S
 1 D I Q H T D S P S T L S A S V G D R V T
 21 25 30 35 40
 21 I T C K A S Q D V G S A V V W H Q Q K S
 21 I T C K A S Q D V G S A V V W H Q Q K P
 41 45 50 55 60
 41 G Q S P K L L I Y N A S T R H T G V P D
 41 G K A P K L L I Y N A S T R H T G V P S
 61 65 70 75 80
 61 R F T G S G S G T D F T L I T I N V O S
 61 R F T G S G S G T D F T L I T I S S L C P
 81 85 90 95 100
 81 E D I A D Y S C Q Q Y S I F P I T F G C
 81 D D F A T Y S C Q Q Y S I F P I T F G C
 101 105 107
 101 G T R L E L K
 101 G T R V E V K

FIG. 14C

1 5 10 15 20
 1 D I V H T D S H K F M S T S V G D R V S
 1 D I Q H T D S P S T L S A S V G D R V T
 21 25 30 35 40
 21 I T C K A S Q D V G S A V V W H Q Q K S
 21 I T C K A S Q D V G S A V V W H Q Q K P
 41 45 50 55 60
 41 G Q S P K L L I Y N A S T R H T G V P D
 41 G K A P K L L I Y N A S T R H T G V P S
 61 65 70 75 80
 61 R F T G S G S G T D F T L I T I N V O S
 61 R F T G S G S G T D F T L I T I S S L C P
 81 85 90 95 100
 81 E D I A D Y S C Q Q Y S I F P I T F G C
 81 D D F A T Y S C Q Q Y S I F P I T F G C
 101 105 107
 101 G T R L E L K
 101 G T R V E V K

FIG. 14D

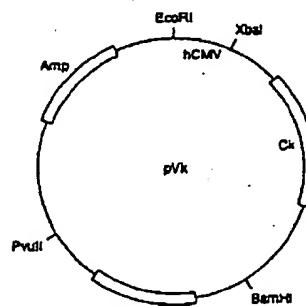


FIG. 15B

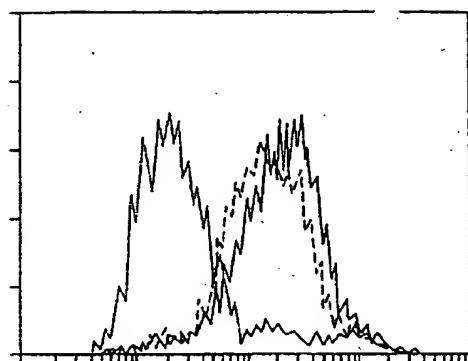


FIG. 16A

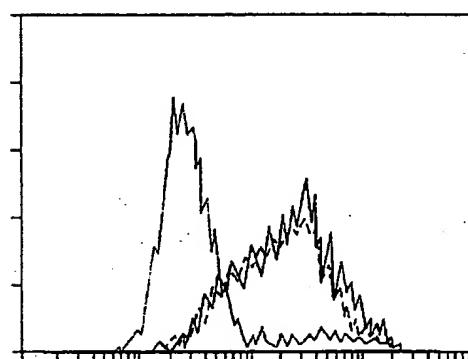


FIG. 16B

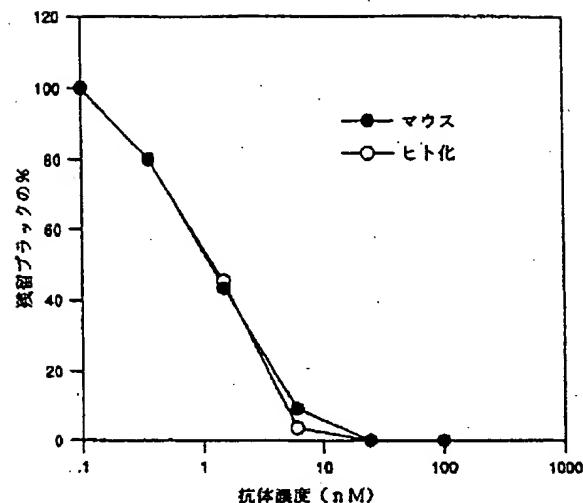


FIG. 17A

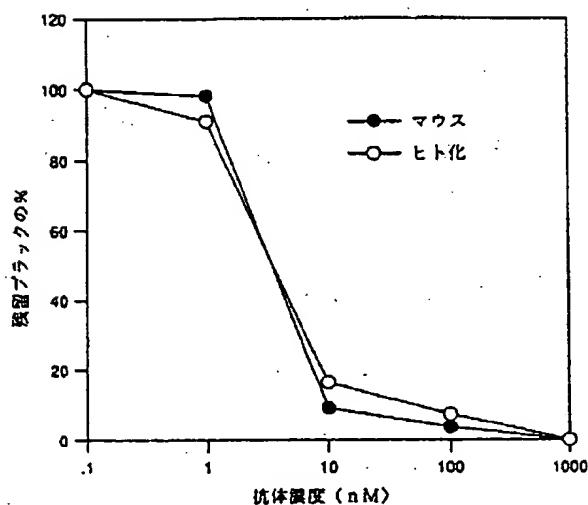


FIG. 17B

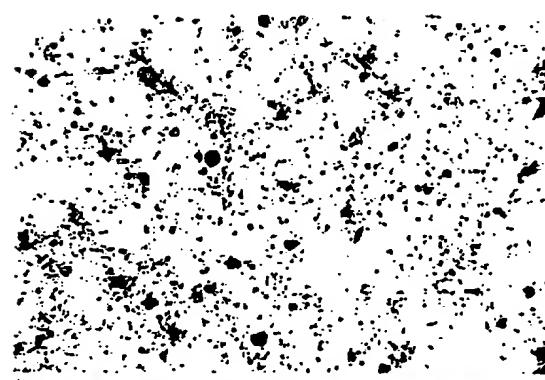


FIG. 18A



FIG. 18B

特表平6-503963 (32)

30 ATGGAGAAAGACACACTCCCTCTATGGGCTCTGCCTCTGGGTCAGGTCACAGG
 M E K D T L L W V L L W V F G S T G
 90 GACATGCTGCTGACCCAAATCTCCAGCTCTTGCCTCTAGGGCAGAGGCACCC
 D I V L T Q S P A S L A V S L G O R A
 150 ATCTCTGAGGAGCCACGGAAAGCTGATTAATATGGCATAGTTATGAAACTGGTC
 I S C R A S E S V D N Y G I S F M H N K F
 210 CACACAAACAGGACAGCCACCCAAACTCTCATCTATGGCTGCATCCAACAGGATCC
 Q O K P G Q P P K L L I A A S N C G S
 270 GGGCTCCCTGAGGAGGTTAGCTGAGCTGGCTGGGACAGCTTCACTCTAACATCC
 G V P A R F S G S G S G T D F S L N I H
 330 CCTATGGAGGAGGATGATACCTCAATGTTCTGCTAGCAAAAGTAAGGGAGGTTGGTGC
 P H E E D D T A M Y T C Q Q S K E V F W
 390 ACGTCGGTGGAGGACCAAGCTGGAAATCAA
 I F G G G T K L E I K

FIG. 19A

30 ATGGGATGGAGCTGGATCTCTCTCTCTGTCAGGAGCTGGCAGGGCTCCACTCTGAG
 M G W S N I F L L S C T A G V H S E
 90 GTCAGCTTCAAGCTGAGGACCTGAGCTGGATGAAACCTGGGCTCACTGAAGAGATATCC
 V G L O O S G P E L V K P G A S V K I S
 150 TCCAGGCTCTGGATACACATTCTGACTGACAACTGACTGGGTGAAGGCAAGGCAAT
 C K A S G Y T F T D Y N M H N V K Q S K
 210 GGAAGACCTCTGACTGGATATTTATCCCTACAAATGGTGGTACTGGCTACAAAC
 G K S L E N I G Y I Y P Y N G G T G Y N
 270 CAGAGTTCAAGGCAAGGCAAGCTGACTGAGCAATCTCTCCAGCACAGGCTTACAT
 C K F E K A T L T V D H S S S T A T K
 330 GCTATGGACTCTGGGTCAGGAACCTGAGTCACGGCTCTGCGAGCTTACTGCAAGAGGGCTTCC
 D V R S L T S E D S A V Y Y C A R G R P
 390 GCTATGGACTCTGGGTCAGGAACCTGAGTCACGGCTCTGCGAGCTTACTGCAAGAGGGCTTCC
 A M D Y K G E G T S V T V S S

FIG. 19B

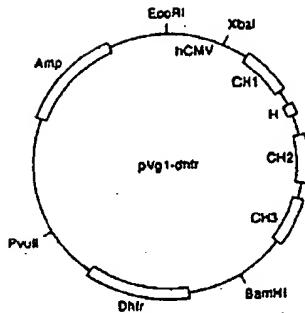


FIG. 20A

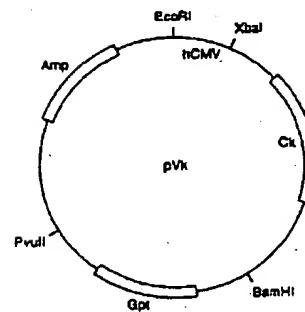


FIG. 20B

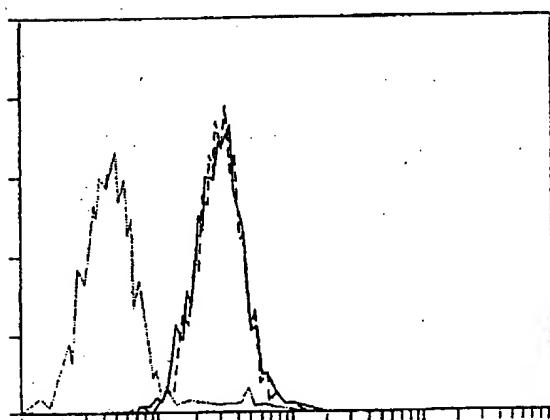


FIG. 21

1 D I O M T O S P S T L S A S V G D R V T
 1 D I O M T Q S P S S L S A S V G D R V T
 21 I T C R A S O S I N T N L A W Y
 21 I T C R A S E S V D N Y G I S F M N W E
 37 Q Q X P G G A P K L L N Y K A S S L E S S
 41 Q Q X P G G A P K L L I Y A A S N O G S
 57 G V P S R F I G S G S G T E F T L T I S
 61 G V P S R F I G S G S G T D F T L T I S
 77 S L O P D D F A T X Y C O O Y N S D S K
 81 S L O P D D F A T Y Y C O O S K E V R W
 97 N F G Q G T K V E V K
 101 I F G Q G T K V E I K

FIG. 22A

1 Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V V K V
 1 Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V V K V
 21 S C R A S G C T F S A S A I I I N V R Q A
 21 S C R A S G Y T F T D Y N M H N V R Q A
 41 P G Q G L E H H M G G I V P M F G P P N Y
 41 P G Q G L E H H M G G I V P M F G P P N Y
 61 A Q K F Q G R V T I T A D E S T N T A Y
 61 N O K F K S K A T I T A D E S T N T A Y
 81 M E L S S L R S E D T A F Y F C A G G Y
 81 M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R G
 101 G I T S P E Z E Y N G G L V T V S S
 101 R P A M D Y H G Q G T L V T V S S

FIG. 22B

特表平6-503963 (33)

ma1

```

10 20 30 40 50 60
TATATCTAGA CCACCATCGG ATGGAGCTGG ATCTTTCCTC TCTCCCTGTC AGGAAGTGT
70 80 90 100 110 120
GGGCTCCACT CTAGGGTCA GCTGGTGAG TCTGGAGCTG AGGTGAAGAA GCGCTGGGAGC
130
TCAGTCAGG TT

```

ma2

```

10 20 30 40 50 60
ACCGGGTACCC ACCATGTTAA GCATTAATAT ATCCATCA TTCCAGGCTG TGGCCAGGAG
70 80 90 100 110 120
CCTGGCTCAC CCATCCATG TTGAGTCAG TGAAGGTGTA GCGAGAGCT TTGAGGAAA
130
CCCTCACTGA CCT

```

ma3

```

10 20 30 40 50 60
TGGGGTACCC CCTACACACC AGAAGTCAA GAGCAAGGCC ACATTAACAG CAGACGGAG
70 80 90 100 110
TACTAACACA GCCTACATGG AACTCTCCAG CCTGGAGCTG GAGGACACTG CA

```

ma4

```

10 20 30 40 50 60
TATATCTAGA CCACCATCTT ACCTGAAGAG ACAGTGAACCA GAGTCCTG GCGCCAGTAG
70 80 90 100 110
TCCATAGCG GCGCCCTCT TCCGAGTAA TAGACTGAG TGTCTCAGA C

```

ma5

```

10 20 30 40 50 60
TATATCTAGA CCACCATGGA GAAAGACAA CTGGCTGATG GGGTCTGCT TCTCTGGGTT
70 80 90 100 110 120
CCAGGTTCCA CAGGTGACAT TCAGATGACC CAGTCCTGGA CCTCTCTGTC CGCATCAGTA

```

GG

ma6

```

10 20 30 40 50 60
TCAGAAGCTT AGGAGCCTC CCGGGTTCT CTGGGACCA GTTCATAAAG CTAATGCCAT
70 80 90 100 110 120
AATGTCGAC ACTTGGCTG GCTCTGCAAG TGAATGGTAC CCTGTCTCT ACTGATGCGG

```

AC

ma7

```

10 20 30 40 50 60
TCTTAAGCTT CTGATTTAGG CTGCATCCAA CCAAGGCTCC GGGGTACCTT CTGGCTCTC
70 80 90 100 110
AOGCAGTGGAA TCTGGGAGAG ACTTCACCTCT CACCAATTCA TCTCTGAGGC CTGATGACT

```

ma8

```

10 20 30 40 50 60
TATATCTAGA CTGGGATTCT TACTTACCTT TGATCTCCAC CTGGTCTCT TGACGGAAAC
70 80 90 100 110
TCCACGGGAC CTCTTACTT TGCAGACAGT AATAGGTTGC GAAAGTCATCA GCGTGCAG

```

FIG. 23A

FIG. 23B

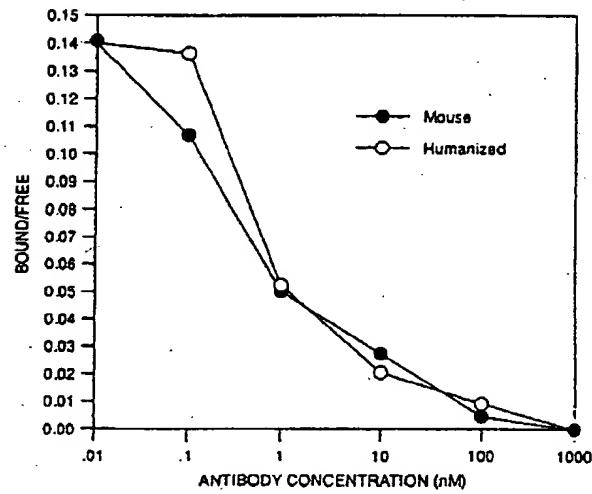


FIG. 24

```

30 60
ATGGGGTTCACCCAGATACTTCTGACTTATGCTTTGGATTTCAAGCTCCAGGGT
H V F T Q I L G L N L M I S A S R J
| 90 120
GATATTGGTAACTCAGTCCTCCACCCCTGCTGTAACCTCCGGGAGATAAGCCCTGACT
D I V L T O S P A T L S V T P G D S V S
| 150 180
CTTTCCTGAGGCGGAGCAAAGTATTAGCAACAAACCTACACTGGTATCAACAAACATCA
L S C R A S O S I S H N L M V Y Q O R S
| 210 240
CATGAGTCTCCAGGCTCTCATCAGTATGCTTCCACCTCTCTGGATCCCTCC
H E F P K L L I K F A E Q I S G I S F S
| 270 300
AGTTCAGTGGCAAGTGGATCAGGGACAGATTTCTACTCTACTGTCAACGGTGGAGAC
P F G S G S G D F T L S V N G V I T
| 330 360
CAACATTTGCAAGTATTCTCTAACACACTAACAGTGGCCCTCATACCTTCCGGAGGG
E D F G H Y F C D O O S N H P M T F G G
| 390
GGGACCAAGCTGGAAATAAAA
G T K L E I K

```

FIG. 25A

```

30 60
ATGGGGATGGGGCTGGATCTTCTCTCTCTGTCAGGAACCTCCAGGTGGTCACTCTGAG
H G H S V I F L F L L S G T A G V H S E
| 90 120
GTCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAACCTGGAGCTTCATCAGATGATCC
V Q I Q O S G F E L V K P G A S H K I S
| 150 180
TGCAGGGCTCTCTGTTACTCTACCTACCTGAGCTCCACCAACCTCCAGGACAGCCAT
C K A S V Y S T F G Y H N V X Q S M
| 210 240
GACAGAGACCTTGGATGGGACTTAAATCTTACAAATGGTGGTACTAGCTACAC
G C H L E W I G L I N P Y H G T S Y N
| 270 300
CAGTACCTAACGGGAAAGGCCACATTAACCTGAGACAAGTCATCCAAACACAGCTACATG
C R F K S X A T L T D K S S H T A Y K
| 330 360
GAGCTCTGAGCTGACATCTGGGAGCTCTGGAGCTTAACTGAGACAGCTACAGACAGCGGGGTT
C T F S I T S A D S A V Y Y C T R A G E
| 390
GAGACTATCTATGGACTACTGGGGTCAGGAACCTCACAGCACGGTCTCCCTA
C T F S X T V W G O G T S V T V E S

```

FIG. 25B

特表平6-503963 (34)

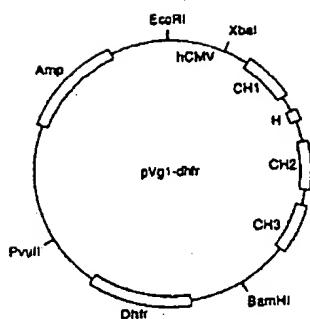


FIG. 26A

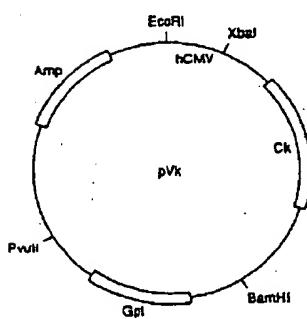


FIG. 26B

1 E I V L T Q S P O T L S L S P G E R A T
1 E I V L T Q S P G T L S L S P G E R A T
21 L S C R A S Q S V S S G Y L G N Y Q Q K
21 L S C R A S Q S V S S G Y L G N Y Q Q K
41 P G Q A P R L L I Y G A S S R A T G I P
40 P G Q A P R L L I Y G A S S R A T G I P
61 D R F S G S G S G T D F T L T I S R L E
60 D R F S G S G S G T D F T L T I S R L E
81 P E D F A V Y Y C Q Q Y G S L G R T F G
80 P E D F A V Y Y C Q Q S N S W P H T F G
101 Q G T K V E I K
100 Q G T K V E I K

FIG. 27A

1 Q V O L M Q S G A E V K K P G S S V R V
1 Q V O L V Q S G A E V K K P G S S V R V
21 S C K T S C G T F V D Y K G L W V R Q A
21 S C K A S G Y S F T G Y T H N W V R Q A
41 P G K G L E W V G Q I P L R F N G E V K
41 P G K G L E W V G C L I N P Y N G G T S Y
61 N P G S V V R V S V S L K E S P N Q A H
61 N O K P K G R V I V S L K P S F N Q A H
81 M E L S S L F S S E D T A V Y Y C A R E Y
81 M E L S S L F S S E D T A V Y Y C I R R
101 G F D T S D Y Y Y Y W G Q G T L V T V
100 G F D T S D Y Y Y Y W G Q G T L V T V
121 S S
118 S S

FIG. 27B

jb16
10 20 30 40 50 60
TAGATCTAGA CCACCATGGT TTTCACACCT CAGATACTAG GACTCATGCT CTTCGGATT
70 80 90 100 110 120
TCAGCTCTCA GAGCTGAAAT TGTCCTAACT CAGTCCTCGAG CCACCTCTANG CTTATCACCG
GGAGAAGGG

jb17
10 20 30 40 50 60
TAGACAGAAAT TACCCGCTAC TTGATAAGTA GACCTGGAG TGTGCGGTT TTTCGTTGCT
70 80 90 100 110 120
ACCAGTGTAG TTGTTGCTA ATATCTTGGC TGGCCCTGCA GCAAACTGTA GCGCTTTC
CCGGTGTAT

jb18
10 20 30 40 50 60
AAGAGAATTG ACCGCTTCAAC GTCGATCTCT GGRATACCCG ATAGGTTGC TGGCAGTGG
70 80 90 100 110 120
TCAGGCTACAG ATTTCACCT CACAACTAGT AGGCTCGAGC CGGAAGATTG TGC

jb19
10 20 30 40 50 60
TAGATCTAGA CTTCAGAGA CTACTTACGT TTATTTCTA CCTTGCTCC TTTCGGAGAC
70 80 90 100 110 120
CTATGAGGCG AACTCTTAACT CTCTTGACAA TAATACACAG CAAATCTC CGGCT

jb20
10 20 30 40 50 60
TATATAGGTAA CCACCATGGT ATGGAGCTGG ATCTTTCTCT TCCCTCTGTC AGGAATGCA
70 80 90 100 110 120
GCTGTCCTACCT CTCAGTCGA ACTGTCAG TCTGGAGCTG AGGTAAAGAA GCGTGGAACT
130
TCAGTAAAGAG TTTC

jb21
10 20 30 40 50 60
TATATAGGTAA CCACCATGGT AAGGATTAAT AAGTCCTAAC CACTCAAGTC CTTTTCCAGG
70 80 90 100 110 120
TGCCTGTCCTACCC ACCAGCTTC ACGGATACCC TGTGATAGAG TATCCGGAGG CTTTGAGG
130
AACTCTTACT GAAAC

jb22
10 20 30 40 50 60
TATATAGGTAA CCACCATGAA CCAGAAGTC AAGGGCAGAG TTACAGTC TTTCGACCT
70 80 90 100 110 120
TCATTTAACCC AGGCTTACAT GGAGCTCGAT AGTCGTTTT CTGAGACAC TGCAGT

jb23
10 20 30 40 50 60
TATATCTAGA GGGCAATTCTT ACCTGAGGAG AGGGTGTACTA AGGTTCCTG ACCCCAGTAG
70 80 90 100 110 120
TCCATAGAAAT AGTCCTGAAAC CCCCCGCTCTT CTACAGTAAT AGACTGCACT GTCTTC

FIG. 28A

FIG. 28B

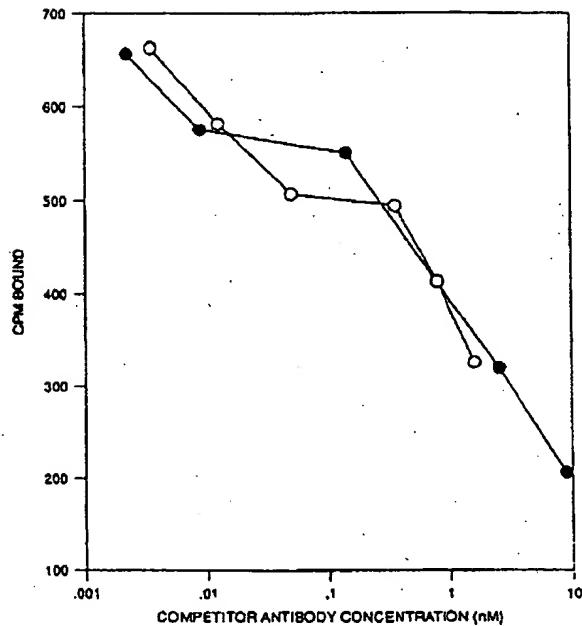


FIG. 29

30 ATGACATCAGACCGCATGGGCATCAAGATGGAATCACAGACTCTGGCTCATATCCATA
 M H O T S M G I K M E S Q T L V F I S I 60
 90 TGTATCATCCCTCTCTGGTAGCAACAGCTACAGGTGCTCTCCAGGTCCAACYGCAG
 C I I L F L V A T A T G V L S Q V Q L Q 120
 150 CAGCCTGGGGCTGACCTTGATGCTGGCTCCAGTCAGCTGCTCTGGCT 180
 Q P G A D L V M P G A P V K L S C L A S
 210 GGCTACATCTCACCAAGCTCTGGATTAACCTGGTGAAGCAGGCCCTGGACGAGCC 240
 G Y I F T S S N I N V K Q R P G R C I
 270 GAGTGGATTGGAAGGAATGATCCCTCCGATGGTGAAGTTCACTACAAATCAAGATTCAAG 300
 E W I G R I D P S D G E V H Y N Q D F K
 330 GACAAGGCCACACTGACTGTAGACARAATCCCTCCAGCACGCCATCTCAACTCAACAGC 360
 D K A T L T V D K S S S T A Y I Q I N S
 390 CTGACATCTGAGGACTCTGGGCTCTGGCTAGAGGATTCTGCCCTGGTTGCT 420
 L T S E D S A V Y Y C A R G F L P W F A
 450 GACTGGGGCCAGGGACTCTGGTCACTGTCTGCCA
 D W G Q G T L V T V S A

FIG. 30A

30 ATGCATCAGACCGCATGGGCATCAAGATGGAATCACAGACTCTGGCTCATATCCATA
 M H O T S M G I K M E S Q T L V F I S I 60
 90 CTGCTCTGGTATATGGTGCATGGGAACATTGTATGACCCAAATCTCCCAATCTCCATA 120
 L L W L Y G A D G N I V H T Q S P K S M
 150 TACGTGTCAATAGGAGAGGGTCACTTGAGCTGCAAGGCCAGTGAATAATGTGGATACT 180
 Y V S I G E R V T L S C K A S E N V D T
 210 TATGTATCCTGGTATCAACAGAACAGAGGCACTCTCTAAACTGCTGATATATGGGCA 240
 Y V S Y Q K P E Q S P K L L I Y G A
 270 TCCAACCGGTACACTGGGGTCCACGGATCCCTCACGGGCAGTGGATCTGCAACAGATT 300
 S N R Y I G V H D R F T G S G S A T D F
 330 ACTCTGACCATCACCACTGTGCAAGGCTGAACCTTGCAAGATTACACTGTGGACAGACT 360
 T L T I S S V Q A E D L A D Y H C G O S
 390 TACAACATATCCATTCACTGCGCTCGGGGACAAGATTGGAAATAAG
 Y N Y P E T F G S G T K L E I K

FIG. 30B

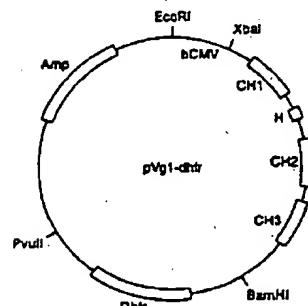


FIG. 31A

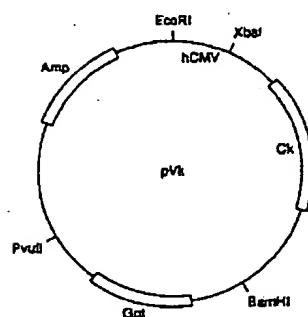


FIG. 31B

特表平6-503963 (38)

1 D I O M T Q S P S T L S A S V G D R V T
 1 D J O M T Q S P S T L S A S V G D R V T
 21 I T C R A S Q S I N T N L A H Y Q Q K P
 21 I T C X A S E N V D T Y V S W Y Q Q K P
 41 G K A P K L L H Y K A S S L E S S G V P S
 41 G K A P K L L I Y G A S N R Y I G V P S
 61 R F I G S G S G T E F T L T I S S S L G P
 61 R F I G S G S G T D F T L T I S S S L G P
 81 D D F A T Y Y C Q Q Y N S D S K N F G
 81 D D F A T Y Y C G O S Y N Y P F T F G
 100 Q G T K V E V K
 100 Q G T K V E V K

FIG. 32A

1 Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K V
 1 Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K V
 21 S C K A S G G T F S R S A I I W V R G A
 21 S C K A S G Y I F T S S M I N H V R G A
 41 P G Q G L E W H G G I V P M F G P P K Y
 41 P G Q G L E W H G G I V P M F G P P K Y
 61 A Q K F Q G R V T I T A D E S T N T A Y
 61 N Q D E K D R V T I T A D E S T N T A Y
 81 M E L S S L R S E D T A F Y F C A R G G Y
 81 M E L S S L R S E D T A V Y V C A R G G Y
 101 G I Y S P E E Y N G G L V T V S S S
 101 I P W F A D W G O G I L V T V S S S

FIG. 32B

rh10
 10 20 30 40 50 60
 TTTTCTAGA ACCACATGG AGACAGATAC CCTCCCTGCTA TGGGTCTCTC TGCTATGGCT
 70 80 90 100 110
 CCAGGATCA ACCGGAGATA TTCAGATGAC CGACTCTCGG TCGACCTCT CTGCT

rh11
 10 20 30 40 50 60
 TTTTAAGCTT GGGAGCTTTC CCTGGCTCTC GCTGATAACCA GGATACATAA GTATCCACAT
 70 80 90 100 110 120
 TTTCACCTGGC CTTCAGCTT ATGGTGACCC TATCCCGACG CCTACCCAGAG AGGTTCACCG

rh12
 10 20 30 40 50 60
 TTTTAAGCTT CTAATTTATG GGGCATCCAA CGGGTACACT GGGGTACCTT CACCGTTTAC
 70 80 90 100 110
 TGGCAGTGGA TCTGGGACCC ATTCACCC CACATACCC TCTCTGGACG CAGATGAT

rh13
 10 20 30 40 50 60
 TTTTCTAG ACCAAAGTC TACTTACCT TGACCTCTAC CCTGGTCCCG TGACCGAAC
 70 80 90 100 110 120
 TGAATGGATA GTTGTAACTC TGTCCCGAGT AATAAGTGGC GAAATCAGTC GGCTCCAGAG

FIG. 33A

rh20
 10 20 30 40 50 60
 TTTTCTAGA CCACCATGG ATGGAGCTGG ATCTTCTCTC TCTCTCTGTC AGGTACCGGG
 70 80 90 100 110
 CGGCTCCACT CTAGGGTCCA CCTGGTCCAG TCTGGGCTG AAGTCAGAA ACC

rh21
 10 20 30 40 50 60
 TTTGAACTC TCCAGACCTT GTCAGGGGGC CTGCGTACCC CAGTTTATCC AGGAGCTAGT
 70 80 90 100 110 120
 AAAGATCTAG CGAGACCTT TCCAGGAGAC CTTCAAGGGAG CTCCAGGTT TCTTGAATC

A

rh22
 10 20 30 40 50 60
 TTTGAACTC TCTGGGAT GGGAGGATT GATCTCTGG ATGGTGAAT TCACTACAA
 70 80 90 100 110 120
 CAAGATTTCA AGGACCTGT TACAAATTACA GCAAGGGAT CCACCAATAC AGCTTACAA
 130
 GAATCTAGA GCGTGAG

rh23
 10 20 30 40 50 60
 TTTGAACTA GCGTTAAGG ACTCACTGA GGAGACTGTC ACCAGGTTTC CTGGGCTCA
 70 80 90 100 110 120
 GTCAAGAAC CAGGGCAGAAT ATCTCTTGC ACAGTAAATAG ACTGGAGTGT CCTCTGATC
 130
 CAGCTTCTCA AGT

FIG. 33B

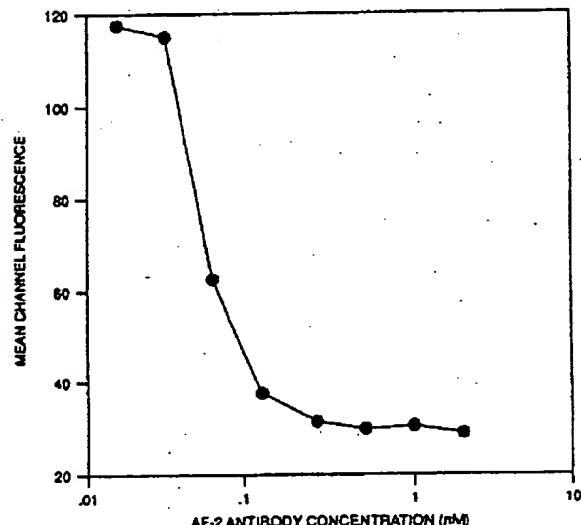


FIG. 34

國 研 究 院 報 告

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (Indicate the subject matter, using the same language as the specification)		Application No. PCT/US1987/00071 According to International Patent Classification or to both National Classification and IPC IPC (16): A61P 31/14, 39/06, C07E 11/00 US CL.: 529/387, 391, 424/65.91	
II. FILING SEARCH			
Information Communication Searcher* Christopher J. Barnes			
Country or Region U.S.		Document Searcher Christopher J. Barnes	
Document Searcher (Enter name of the document searcher)			
Document Searcher Address Christopher J. Barnes			
Document Searcher Telephone Number 520/387-3881 x 424/65.91			
Document Searcher Email Address Christopher.J.Barnes@uspto.gov			
Document Searcher fax number 520/387-1205			
Document Searcher Internet Address http://www.uspto.gov/uspto/			
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**			
Category Criterion of Document** (with respect to which category of the relevant document)		Relevant to Class No.	
T	Journal of Biological Chemistry. Volume 260, No. 22, issued 09 October 1985. Lambert et al. "Purified Immunoprotein That Reacts Specifically with Human Lymphoid Cells", pages L2015-L2016. see entire document.	10,33,59,60	
T	U.S. A. 4,849,396 (Yurdal et al) 04 July 1989, see columns 8-12.	1-9	
T	Journal of Experimental Medicine. Volume 163, issued July 1986. Kirkham et al. "Administration of an Anti-Tissue Transplant Receptor Monoclonal Antibody Prolongs Cardiac Allograft Survival in Rats", pages 351-362. see entire document.	1-9	
T	The Journal of Immunology. Volume 136, No. 9, issued April 1986. Ochiishi et al. "A Monoclonal Antibody (Anti-Tac) Reactive with Human T-Cells but Functionally Inactive Human T Cells", pages 1393-1397, see pages 1393-1394.	1-10	
T	Nature. Volume 321, issued 29 May 1986. Jones et al. "Replacing the Complementarity Determining Regions in a Human Antibody with Those from a Mouse", pages 522-525. see pages 522-523.	1-9, 11-31, 30-58	
* Searcher information of other documents			
1- "other documents" refers to the general class of the art which is not specifically mentioned in the specification.			
2- "other documents" not mentioned in the specification.			
3- "other documents" not mentioned in the specification.			
4- "other documents" refers to those dealing with prior art documents or which is used to establish the published date of the application or to establish the reason for opposition or dependence relating to an application, one, or, correlated to other issues.			
5- "other documents" refers to those dealing with prior art documents or which is used to establish the published date of the application or to establish the reason for opposition or dependence relating to an application, one, or, correlated to other issues.			
6- "other documents" refers to those dealing with prior art documents or which is used to establish the published date of the application or to establish the reason for opposition or dependence relating to an application, one, or, correlated to other issues.			
7- "other documents" refers to those dealing with prior art documents or which is used to establish the published date of the application or to establish the reason for opposition or dependence relating to an application, one, or, correlated to other issues.			
V. CERTIFICATION			
Date of the Actual Completion of the Information Search 06 FEBRUARY 1992		Date of Mailing of the Information Search Report 27 FEBRUARY 1992	
Information Searcher Authority ISA/U9		Signature of the Information Searcher Lila Barnes	

II. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category	Classification of Document, ¹⁰ with indication, where appropriate, of the document's subject ¹¹	Reference to Classification
Y	Journal of Virology, Volume 52, No. 9, issued 1988. Brist et al. "Isolation of Cytolytic T-Dependent and Independent Neutralising Antibodies by Immunoprecipitation from Human Cytomegalovirus gp64 (gB1)". Pages 3309-3318. See the entire abstract.	34-49
Y	Dist. Markers, Volume 5, No. 4, issued 1987. Pappagallo et al. "Characterisation of Monoclonal Antibodies to the Human Myeloid-differentiation Antigen, 'gp87' (CD33)". pages 218-225. See the entire abstract.	33-38
Y	Antiviral Research, Volume 10, No. 4, issued 1988. Bernstein et al. "Antibody to Cloned HSV Glycoproteins and D Plus Adult Human Leukocytes Protect Monocytic Cells from Lethal HSV Infection". pages 173-187. See the entire abstract.	11-23

フロントページの続き

(51) Int. CL. 6
 A 61 K 35/74 39/395
 A B A D 9284-4C
 A D Y Y 9284-4C
 S 9284-4C
 C 0 7 K 15/14
 // C 1 2 N 15/13
 (C 1 2 P 21/08
 C 1 2 R 1:91)

識別記号 庁内整理番号 F I
 Z 7431-4C
 U 9284-4C
 8517-4H

(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE,
 DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, MC, N
 L, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM
 , GA, GN, ML, MR, SN, TD, TG), AT
 , AU, BB, BG, BR, CA, CH, CS, DE,
 DK, ES, FI, GB, HU, JP, KP, KR, L
 K, LU, MG, MN, MW, NL, NO, PL, RO
 , SD, SE, SU

(72) 発明者 コー, マン スン
 アメリカ合衆国, カリフォルニア 95014,
 キュバティーノ, ヨシノ ブレイス
 10230

(72) 発明者 シュナイダー, ウィリアム ピー,
 アメリカ合衆国, カリフォルニア 94041,
 マウンテン ピュー, ロレット ストリー
 ト 484

(72) 発明者 ランドルフィ, ニコラス エフ,
 アメリカ合衆国, カリフォルニア 95035,
 ミルビタス, シーサイド ドライブ 246

(72) 発明者 コーリン, カザリン エル,
 アメリカ合衆国, カリフォルニア 94114,
 サンフランシスコ, ドーラーズ アベニュー
 1509

【公報種別】特許法第17条第1項及び特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成11年(1999)10月12日

【公表番号】特表平6-503963

【公表日】平成6年(1994)5月12日

【年通号数】

【出願番号】特願平4-503758

【国際特許分類第6版】

C12P 21/08

A61K 31/00 635

637

39/395

C07K 16/46

C12N 15/02

15/09

//(C12N 15/02

C12R 1:91)

【F I】

C12P 21/08

A61K 31/00 635 A

637

39/395 D

U

Y

C07K 16/46

C12N 15/00 C

A

特表平6-503963

手続修正書

平成10年2月14日

特許行政書

事件の表示

平成4年特許第503758号

補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 アメリカ合衆国、カリフォルニア 94043, マウンテン ビュー、
ガルシア アベニュー 2375

名前 プロテイン デザイン ラブス、インコーポレイテッド

代理人

住所 〒550-0015 大阪府大阪市中央区城見一丁目2番27号

クリスカルタリー15階

氏名 (7825) 弁理士 山本 英美

電話 (大阪) 06-949-3910

4. 補正対象構造名

請求の範囲および明細書

5. 補正対象項目名

請求の範囲および明細書

6. 補正の内容

(1) 請求の範囲を別紙のように補正します。

(2) 明細書第5頁15~19行の「例えば、pET Lambda Ii/IIシリーズII BMAS BIIは、byk速伝子含有BindIII-BglII フラグメントを、byk速伝子を含みをしてB II部に至る660bpのフラグメントに置き換えることによって作製した (Simone et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 2405 (1983))」を、「例えば、pET-dhfr はプラスミドpG1 (1980年9月28日提出の共有調査実用特許第07/390,274号) より、byk速伝子含有BindIII-BglII フラグメントを、660bpの速伝子を含みをしてB II部に至る660bpのフラグメントに置き換えることによって作製した (Simone et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 2435 (1983))」に補正します。

請求の範囲

1. その範囲および重複がそれぞれ、以下の内の上段およびBの上段に示されるマウスM195抗体由來のヒト化免疫グロブリンであって、少なくとも10¹⁴M⁺の結合親和力を有し、そしてヒトCD33抗原への結合について該マウス抗体と競合する、ヒト化免疫グロブリン:

1 Q I V L T O S P A I N S A S P G E K V T
1 D I Q H T O S P S S L S A S V G D R V T
21 M T C S G S S S V S F M Y W Y Q Q R P C
21 I T C S G S S S V S F M Y W Y Q Q R P C
41 S S P R L L I Y D T S M L A S G V P V R
41 K A P K L L I Y D T S M L A S G V P V R
61 F S G E G S G T S Y S L T I S R M E A E
61 F S G E G S G T S Y S L T I S R M E A E
81 D A A T Y Y C C O O M S T Y P L T F G A G
81 D I A T Y Y C C O O M S T Y P L T F G A G
101 T K L E L R
101 T K V E V R

A

1 Q V Q L K Q S G P G L V Q P S Q S L S I
1 E V Q L L E S G G G L V Q P G Q S L R L
21 T C T V S G F S V T S X G V H W I R Q S
21 S C A A S G E T V T S V G V H W V R Q A
41 P G K G L E W L G V I W S G G S T D Y N
41 P G K G L E W V G V I W S G G S T D Y N
61 A A F I S R L T I S K D N S K S Q V F E
61 A A F I S R E T I S R D N S K N T L Y L
81 K V N S L O P A D T A I I Y Y C A R A G D
81 Q M H S L Q A E D P A I I Y Y C A R A G D
101 T H Y D G F A Y W G Q G T L V T V S A
101 T H Y D G F A Y W G Q G T L V T V S S

B

1 Q V Q L K Q S C P C I L V Q P S Q S L S I
1 E V Q L L E S G G G L V Q P G Q S L R L
21 T C T V S G F S V T S X G V H W I R Q S
21 S C A A S G E T V T S V G V H W V R Q A
41 P G K G L E W L G V I W S G G S T D Y N
41 P G K G L E W V G V I W S G G S T D Y N
61 A A F I S R L T I S K D N S K S Q V F E
61 A A F I S R E T I S R D N S K N T L Y L
81 K V N S L O P A D T A I I Y Y C A R A G D
81 Q M H S L Q A E D P A I I Y Y C A R A G D
101 T H Y D G F A Y W G Q G T L V T V S A
101 T H Y D G F A Y W G Q G T L V T V S S

B

4. 前記ヒト化免疫グロブリンが既に免疫グロブリンフレームワークに実質的に想同であるヒトフレームワークを含む、請求項1から3のいずれかに記載のヒト化免疫グロブリン。

5. 請求項1から4のいずれかに記載のヒト化免疫グロブリンを含む医薬成物。

6. 細胞障害剤をさらに含む、請求項5に記載の医薬成物。

7. 肝臓細胞介導の効度に用いるための、請求項5または6に記載の医薬成物。

A